

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 15 May 2001 (15.05.01)	
International application No. PCT/DE00/02596	Applicant's or agent's file reference TEG/PCT/0002
International filing date (day/month/year) 27 July 2000 (27.07.00)	Priority date (day/month/year) 13 August 1999 (13.08.99)
Applicant HÜNIG, Thomas	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:13 March 2001 (13.03.01)☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Antonia Muller
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

JUNGBLUT, Bernhard
Albrecht, Lüke & Jungblut
Gelfertstrasse 56
D-14195 Berlin
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 14 juin 2001 (14.06.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference TEG/PCT/0002	
International application No. PCT/DE00/02596	International filing date (day/month/year) 27 juillet 2000 (27.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input checked="" type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address HÜNIG, Thomas Mittlere Heerbergstrasse 26 D-97078 Würzburg Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the person	<input checked="" type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address TeGenero GmbH Mittlere Heerbergstrasse 26 D-97078 Würzburg Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: Assignment of international application for all designated States except the United States of America has been recorded.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Margret Fourne-Godbersen
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Translation
10/049464

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

7

Applicant's or agent's file reference TEG/PCT/0002	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/02596	International filing date (<i>day month year</i>) 27 July 2000 (27.07.00)	Priority date (<i>day month year</i>) 13 August 1999 (13.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/395		
Applicant TEGENERO GMBH		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 13 March 2001 (13.03.01)	Date of completion of this report 23 November 2001 (23.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/02596

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-29 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-18 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages _____ 1/16-16/16 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/02596

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 11-17, 18(part)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 11-17, 18(part) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/02596

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

Claims 11-17 (in their entirety) and **Claim 18** (insofar as it relates to an *in vivo* method) concern a subject matter which, in the opinion of this Authority, falls under PCT Rule 67.1(iv). Therefore, a report as to the industrial applicability of the subject matter of this claim is not drawn up (PCT Article 34(4)(a)(i)). See, however, Box V, point 3.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 00/02596

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-18	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10 (entirely), 18 (in part)	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: DATABASE AIDSLINE [Online] AN=1998:8037, 1998
(HEZAREH M. ET AL.) & CONFERENCE ON RETROVIRUSES AND
OPPORTUNISTIC INFECTIONS, Vol. 5, 1998, page 183
D2: DE-A-197 22 888 (T. HÜNIG) 3 December 1998,
mentioned in the application.

1. NOVELTY

The present application is novel (PCT Article 33(2)), because the available prior art does not disclose any uses, compositions, patent components or methods with all the features of **Claims 1-18**.

2. INVENTIVE STEP

However, **Claims 1-18** do not appear to meet the requirements of PCT Article 33(3) for the following reasons:

2.1 Document D1, which is considered the closest prior

art, discloses a differential T-cell induction by immobilised anti-CD3 antibodies and anti-CD28 antibodies in samples from HIV-infected patients using antiviral therapy with AZT, 3TC and IDV. The subject matter of the present **Claim 1** differs therefrom only in that (i) the antibodies are monoclonal and that (ii) these antibodies are used to produce an antiviral pharmaceutical composition which contains the virus inhibitor.

The solution proposed in Claim 1 cannot, however, be considered inventive for the following reasons (PCT Article 33(3)):

Whereas the first difference (monoclonal antibodies) is straightforward to a person skilled in the art, especially since the advantages achieved are readily foreseeable, the second difference (second medical use against virus infection) is obvious to a person skilled in the art, because D1 explicitly mentions the significance of T-cell stimulation for the anti-retroviral treatment of patients. Consequently, the subject matter of Claim 1 does not appear to involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

2.2 Similar objections apply with respect to the pharmaceutical composition of the present **Claim 6**, the treatment method of the present **Claims 11-12**, the use of the present **Claim 16** and the subject matter of the present **Claim 18**.

2.3 Dependent **Claims 2-5, 7-9, 13-15 and 17** do not appear to contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the PCT inventive step requirements, because

their additional features are likewise known from D1 (see abstract).

- 2.4 Document D2 (see abstract), which is considered the prior art closest to **Claim 10** of the present application, discloses monoclonal anti-CD28 antibodies which activate T-lymphocytes in an antigen-unspecific manner. The subject matter of the present Claim 10 differs therefrom only in that the antibody constitutes the packet component of a preparation packet. However, since the inclusion of a known component in a preparation packet is a routine procedure to a person skilled in the art, the subject matter of Claim 10 does not appear to involve an inventive step either (PCT Article 33(3)).

3. INDUSTRIAL APPLICABILITY

The PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing the industrial applicability of **Claims 11-17** (in their entirety) and **Claim 18** (insofar as it relates to an *in vivo* method) in their present form. Patentability may depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognise the industrial applicability of claims to the medical use of a compound; it does, however, allow claims to the first medical use of a known compound or to the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical application.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/02596

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite document D1 or indicate the relevant prior art disclosed therein.
2. Patent applications may not include unpublished disclosures (see page 4, lines 22-23) (see PCT Examination Guidelines, Chapter II-4.17).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. **Claims 1, 6 and 16** do not meet the requirements of PCT Article 6, because the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. The claims attempt to define the subject matter by means of the result that is to be achieved ("antibodies which [...] activate T-lymphocytes [...] in an antigen-unspecific manner"). However, this merely indicates the problem of interest.
2. The definition of the component a) of **Claims 6 and 12** is unclear (PCT Article 6), because it is not apparent whether the expression "preferably" relates to "human-tolerable" or "antibody". In the latter case, the component a) would merely be an optional feature of Claims 6 and 12. For the purposes of the international preliminary examination, therefore, it is assumed that the expression "preferably" relates to "human-tolerable".

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts TEG/PCT/0002	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 02596	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/07/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum. (Tag/Monat/Jahr) 13/08/1999
Anmelder HÜNIG, Thomas		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2.



Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3.



Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**VERWENDUNG CD28 SPEZIFISCHER MONOKLONALER ANTIKÖRPER ZUR HERTELLUNG EINER
PHARMAZEUTISCHEN ZUSAMMENSTZUNG ZUR BEHANDLUNG VON VIRUSINFEKTIONEN**

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____



wie vom Anmelder vorgeschlagen



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K39/395 A61K31/70 A61K31/47 A61P31/12
 //(A61K39/395,31:70),(A61K39/395,31:47)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 17313 A (BIOGEN, INC.) 30. April 1998 (1998-04-30) Seite 23, Zeile 21 -Seite 25, Zeile 10 Ansprüche 28,29,47 ---	1-18
X	DATABASE AIDSLINE 'Online! AN=1998:8037, 1998 M. HEZAREH ET AL.: "Differential T cell induction of productive HIV replication in samples from patients on prolonged suppressive therapy." XP002150584 Zusammenfassung & CONFERENCE ON RETROVIRUSES AND OPPORTUNISTIC INFECTIONS, Bd. 5, 1998, Seite 183 Zusammenfassung 550a --- -/--	1-18



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Oktober 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Nooij, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	U. HENGGE ET AL.: "Randomized, controlled phase II trial of subcutaneous interleukin-2 in combination with highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV patients." AIDS, Bd. 12, Nr. 17, 1998, Seiten F225-F234, XP000877329 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-18
A	T-W. CHUN ET AL.: "Effect of interleukin-2 on the pool of latently infected, resting CD4+ T cells in HIV-1-infected patients receiving highly active anti-retroviral therapy." NATURE MEDICINE, Bd. 5, Nr. 6, Juni 1999 (1999-06), Seiten 651-655, XP002150581 New York, NY, VSA in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-18
A	T-W. CHUN ET AL.: "Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection." NATURE, Bd. 387, Nr. 6629, 8. Mai 1997 (1997-05-08), Seiten 183-188, XP002150582 London, GB in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-18
A	E. BARKER ET AL.: "CD28 costimulation increases CD8+ cell suppression of HIV replication." THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 159, Nr. 10, 15. November 1997 (1997-11-15), Seiten 5123-5131, XP002150583 Baltimore, MD, VSA Zusammenfassung ---	1-18
A	DE 197 22 888 A (T. HÜNIG) 3. Dezember 1998 (1998-12-03) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1,7,8 ---	1-18
A	WO 94 06473 A (SCHERING CORPORATION ET AL.) 31. März 1994 (1994-03-31) das ganze Dokument -----	1-18

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 11-17 (völlig) und 18 (teilweise, so weit es sich handelt um ein in vivo Verfahren) sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/02596

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9817313	A	30-04-1998	AU	5089698 A	15-05-1998
			BG	103416 A	31-01-2000
			BR	9712670 A	19-10-1999
			CN	1237910 A	08-12-1999
			CZ	9901428 A	14-07-1999
			EP	0954333 A	10-11-1999
			NO	991926 A	25-06-1999
DE 19722888	A	03-12-1998	PL	332972 A	25-10-1999
			AU	8432498 A	30-12-1998
			WO	9854225 A	03-12-1998
WO 9406473	A	31-03-1994	EP	0980390 A	23-02-2000
			AU	4856793 A	12-04-1994
			CA	2144648 A	31-03-1994
			EP	0667789 A	23-08-1995
			JP	8501549 T	20-02-1996
			MX	9305713 A	31-05-1994

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 27 NOV 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

15 T


Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts TEG/PCT/0002	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02596	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 13/08/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K39/395		
Anmelder TEGENERO GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 13/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 23.11.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Barz, W Tel. Nr. +49 89 2399 7320



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-29 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-18 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/16-16/16 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
☒ Ansprüche Nr. 11-17 (IA, vollständig), 18 (IA, teilweise).

Begründung:

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 11-17 (IA, vollständig), 18 (IA, teilweise) beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
siehe Beiblatt
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-18
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-18
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-10 (vollständig), 18 (teilweise)
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

PUNKT III:

Die **Ansprüche 11-17** (vollständig) und der **Anspruch 18** (soweit er ein *in vivo* Verfahren betrifft) beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34 (4) (a) (i) PCT). Siehe jedoch Punkt V-3.

PUNKT V:

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: DATABASE AIDSLINE [Online] AN=1998:8037, 1998 (HEZAREH M. et al.)
& CONFERENCE ON RETROVIRUSES AND OPPORTUNISTIC
INFECTIONS, Bd. 5, 1998, Seite 183

D2: DE 197 22 888 A (T. HÜNIG) 3. Dezember 1998, in der Anmeldung erwähnt.

1. NEUHEIT

Die vorliegende Anmeldung ist neu im Sinne des Artikels 33(2) PCT, weil der verfügbare Stand der Technik keine Verwendungen, Zusammensetzungen, Paketkomponenten oder Verfahren mit allen Merkmalen der vorliegenden **Ansprüche 1-18** offenbart.

2. ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT

Jedoch scheinen die **Ansprüche 1-18** aus folgenden Gründen nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT zu erfüllen:

- 2.1 Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart eine differentielle T-Zell-Induktion durch immobilisierte anti-CD3-Antikörper und anti-CD28-Antikörper in Proben von HIV-infizierten Patienten unter

antiviraler Therapie mit AZT, 3TC und IDV. Hiervon unterscheidet sich der Gegenstand des vorliegenden **Anspruchs 1** nur dadurch, daß (i) die Antikörper monoklonal sind und daß (ii) diese Antikörper zur Herstellung einer antiviralen pharmazeutischen Zusammensetzung, die den Virus-Inhibitor enthält, verwendet wird.

Die in Anspruch 1 vorgeschlagene Lösung kann jedoch aus folgenden Gründen nicht als erfinderisch betrachtet werden (Artikel 33(3) PCT):

Während der erste Unterschied (monoklonaler Antikörper) im Rahmen dessen liegt, was ein Fachmann aufgrund der ihm geläufigen Überlegungen zu tun pflegt, zumal die damit erreichten Vorteile ohne weiteres abzusehen sind, ist der zweite Unterschied (zweite medizinische Anwendung gegen Virusinfektionen) für den Fachmann naheliegend, weil D1 explizit die Bedeutung der T-Zell-Stimulation für die anti-retrovirale Behandlung von Patienten erwähnt. Folglich scheint dem Gegenstand des Anspruchs 1 keine erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT) zugrunde zu liegen.

- 2.2 Analoge Einwände gelten gegen die pharmazeutische Zusammensetzung des vorliegenden **Anspruchs 6**, die Behandlungsverfahren der vorliegenden **Ansprüche 11-12** und die Verwendung des vorliegenden **Anspruchs 16** sowie den Gegenstand des vorliegenden **Anspruchs 18**.
- 2.3 Der abhängigen **Ansprüche 2-5, 7-9, 13-15 und 17** scheinen keine Merkmale zu enthalten, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den sie sich beziehen, die Erfordernisse des PCT in bezug auf erfinderische Tätigkeit erfüllen, weil ihre zusätzlichen Merkmale ebenfalls aus D1 (siehe Zusammenfassung) bekannt sind.
- 2.4 Dokument D2 (siehe Zusammenfassung), das als nächstliegender Stand der Technik für **Anspruch 10** der vorliegenden Anmeldung angesehen wird, offenbart monoklonale anti-CD28-Antikörper, die T-Lymphozyten antigenunspezifisch aktivieren. Hiervon unterscheidet sich der Gegenstand des vorliegenden Anspruchs 10 nur dadurch, daß der Antikörper die Paketkomponente eines Präparatepakets darstellt. Da die Aufnahme einer bekannten Komponente in ein

Präparatepaket für den Fachmann jedoch eine Routineprozedur ist, scheint auch dem Gegenstand des Anspruchs 10 keine erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT) zugrunde zu liegen.

3. INDUSTRIELLE ANWENDBARKEIT

Für die Beurteilung der Frage, ob der Gegenstand der vorliegenden **Ansprüche 11-17** (vollständig) und **Anspruch 18** (soweit er ein *in vivo* Verfahren betrifft) gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

PUNKT VII:

1. Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in Dokument D1 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch dieses Dokument selbst angegeben.
2. Das Einbeziehen von unveröffentlichten Offenbarungen (siehe Seite 4, Zeilen 22-23) in Patentanmeldungen ist nicht gestattet (PCT-Richtlinien II-4.17).

PUNKT VIII:

1. Die **Ansprüche 1, 6 und 16** entsprechen nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In den Ansprüchen wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis

zu definieren ("Antikörper, welche [...] T-Lymphozyten [...] antigenunspezifisch aktivieren"); damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben.

2. Die Definition der Komponente a) der **Ansprüche 6 und 12** ist unklar im Sinne des Artikels 6 PCT, weil nicht erkennbar ist, ob sich der Ausdruck "vorzugsweise" auf "humanverträglich" oder auf "Antikörper" bezieht. Im letzteren Fall wäre die Komponente a) lediglich ein optionales Merkmal der Ansprüche 6 und 12. Bei der Vorläufigen Internationalen Prüfung wird daher davon aufgegangen, daß sich der Ausdruck "vorzugsweise" auf "humanverträglich" beziehen soll.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. Februar 2001 (22.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/12224 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 39/395**,
31/70, 31/47, A61P 31/12 // (A61K 39/395, 31:70) (A61K
39/395, 31:47)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02596

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juli 2000 (27.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 39 653.1 13. August 1999 (13.08.1999) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **HÜNIG, Thomas** [DE/DE]; Mittlere Heer-
bergstrasse 26, D-97078 Würzburg (DE).

(74) Anwälte: **JUNGBLUT, Bernhard** usw.; Albrecht, Lücke
& Jungblut, Gelfertstrasse 56, D-14195 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK,
DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF CD28 SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES FOR PRODUCING A PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING VIRUS INFECTIONS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG CD28 SPEZIFISCHER MONOKLONALER ANTIKÖRPER ZUR HERSTELLUNG EINER PHARMAZEUTISCHEN ZUSAMMENSETZUNG ZUR BEHANDLUNG VON VIRUSINFEKTIONEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of monoclonal antibodies which are specific for CD28 and activate the T lymphocytes of several up to all subgroups without the occupation of an antigen receptor of the T lymphocytes and which therefore activate said lymphocytes in an antigen unspecific manner or the invention relates to the use of an analogue thereof for producing a pharmaceutical composition in the form of a preparation or a preparation packet for treating virus infections in humans or lower warm-blooded animals having infected T lymphocytes. The pharmaceutical composition additionally contains a virus inhibitor. The invention also relates to a corresponding pharmaceutical composition and a treatment plan including the pharmaceutical composition.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung lehrt die Verwendung monoklonaler Antikörper, welche für CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenun-spezifisch aktivieren, oder eines Analogen hierzu zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung in der Ausführungsform als Präparat oder Präparatepaket zur Behandlung von Virusinfektionen beim Menschen oder niedrigeren Warmblütern, bei welchen T-Lymphozyten infiziert sind, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich einen Virus Inhibitor enthält, eine entsprechend pharmazeutische Zusammensetzung und einen Behandlungsplan unter Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung.

WO 01/12224 A1

**VERWENDUNG CD28 SPEZIFISCHER MONOKLONALER ANTIKÖRPER ZUR
HERSTELLUNG EINER PHARMAZEUTISCHEN ZUSAMMENSETZUNG ZUR
BEHANDLUNG VON VIRUSINFEKTIONEN**

Gebiet der Erfindung

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung monoklonaler Antikörper, welche für CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, oder ein Analog hierzu, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung in der Ausführungsform als Präparat oder Präparatepaket zur Behandlung von Virusinfektionen beim Menschen oder niedrigeren Warmblütern, bei welchen T-Lymphozyten infiziert sind, eine Paketkomponente mit solchen Antikörpern oder Analogen, ein Verfahren zur Behandlung von Virusinfektionen unter Verwendung einer solchen Zusammensetzung und einen Behandlungsplan unter Verwendung einer solchen Zusammensetzung.

20 Hintergrund der Erfindung

Das HIV durchläuft einen Lebenszyklus, in welchem es in verschiedenen Latenzstadien vorliegen kann. Ein erstes Latenzstadium wird als präintegrativ bezeichnet und meint, daß das HIV zwar in die Wirtszelle importiert und ggf. zumindest teilweise der reversen Transkription unterzogen, jedoch nicht in den Zellkern als Provirus eingebaut ist. Dieses präintegrative Latenzstadium kann latent funktional bleiben über eine Mehrzahl von Wochen bis zur Einbüßung der Funktionsfähigkeit. Die präintegrative Latenz erfordert, daß die Wirtszelle ruht. Ein weiteres Latenzstadium wird als postintegrativ bezeichnet und meint, daß das HIV als Provirus zwar in den Zellkern integriert worden ist, die Wirtszelle jedoch beispielsweise aufgrund von Deaktivierung ruht und folglich

keine Virusreplikation stattfindet. Die postintegrative Latenz ist vergleichsweise langzeitstabil und hält bis zu einer Aktivierung der Wirtszelle an. Eine Aktivierung von latentem (post- oder präintegrativ) HIV enthaltenden Wirtszellen erfolgt durch verschiedene Stimuli mit der Folge der Aktivierung auch der Virusreplikation, wobei die Wirtszelle zerstört und Virus in die Körperflüssigkeit freigesetzt wird. Die vorstehenden Erläuterungen gelten grundsätzlich für alle Retroviren. Virus in einem latenten Stadium wird folgend Latenzvirus genannt.

Bisherige Therapieansätze mit Reverse Transkriptase Inhibitoren und ggf. Protease Inhibitoren unterdrücken die Virusvermehrung nach Aktivierung des Latenzvirus. Somit verschwindet zwar freies HIV unter Therapie aus der Zirkulation, ruhende Leukozyten enthalten jedoch weiterhin Latenzvirus (T.W. Chun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:13193-13197 (1997); D. Finzi et al., Science, 278:1295-1300 (1997); J.K. Wong et al., Science, 278:1291-1295 (1997)). Die Folge ist ein Wiedererscheinen replikationsfähiger Viren bei Unterbrechung der Therapie (M.D. de Jong et al., AIDS, 11:F79-84 (1997)) und Fortschreiten der Erkrankung. Die Therapie mit Reverse Transkriptase Inhibitoren und ggf. Protease Inhibitoren ist jedoch toxisch und eine insofern notwendige lebenslange Behandlung hat daher ihre Grenzen bzw. Bedenken. Zudem ist die Behandlung mit Reverse Transkriptase Inhibitoren und ggf. Protease Inhibitoren mit beachtlichen Kosten verbunden.

30

Stand der Technik

Als Konsequenz aus der vorstehenden grundsätzlichen Problematik wurde vorgeschlagen, latentes HIV der Therapie mit Reverse Transkriptase Inhibitoren und Protease Inhibitoren

35

durch gleichzeitige Behandlung mit immunstimulierenden Agentien, die das latente HIV aktivieren, zugänglich zu machen ("flush out"; O.J. Cohen et al., J. Am. Med. Assoc., 280:87-88 (1998); J. Cohen, Science, 279:1854-1855 (1998); D.D. Ho, Science, 280:1866-1867 (1998); L.K. Schragger et al., J. Am. Med. Assoc., 280:67-71 (1998)). Konkret zeigt die Literaturstelle T.W. Chun et al., Nature Medicine, Volume 5, Number 6, pp. 651-655 (1999), daß durch Einsatz des T-Zellwachstumsfaktors Interleukin 2 (IL-2) zusammen mit der HAART Therapie (siehe hierzu unten) eine signifikante Reduktion der Menge an replikationskompetentem HIV in den ruhenden T-Lymphozyten gefunden wird. Allerdings exprimiert der größte Teil ruhender CD4 T-Lymphozyten keine Rezeptoren für den Wachstumsfaktor IL-2. Diese Zellen und damit das darin enthaltene latente HIV können deshalb durch die Darreichung von IL-2 nicht erreicht werden. Die grundsätzliche vorstehende Problematik bleibt daher bestehen und ist allenfalls geringfügig abgemildert. Hinzu kommt, daß die Darreichung von IL-2 mit beachtlich störenden Nebenwirkungen verbunden ist, welche den Erfolg dieser Strategie noch weiter relativieren.

Die verbreitetste Therapie unter Verwendung von Reverse Transkriptase Inhibitoren ist die HAART Therapie ("hochaktive anti-retrovirale Therapie"). Diese besteht in der kombinierten Anwendung von zwei Reverse Transkriptase Inhibitoren, z.B. die Nukleosidanaloge AZT (bzw. Zidovudine) und 3TC (bzw. Lamivudine), zusammen mit einem oder mehreren Protease Inhibitoren. Ein Beispiel für einen Protease Inhibitor ist IDV (Indinavir). Bezüglich der HAART Therapie, der darin verwendeten Substanzen und des Behandlungsplans wird auf die folgenden Literaturstellen verwiesen: J. Laurence, HAART Regiments: Do the effects last? in The AIDS Reader 7(6):84-85 (1997); R.M. Gulick et al., N. Engl. J. Med., 337:734-739 (1997); S.M. Hammer et al., N. Engl. J. Med., 337:725-733 (1997); und F.J. Jr. Palella et al., N. Engl. J. Med.,

338:853-860 (1998). Weitere Beispiele für geeignete Reverse Transkriptase Inhibitoren sind die Nukleosidanalogue d4T (Stavudine), ddI (Didanosine) und ddC (Zalcitabine) sowie die nicht-Nukleosidanalogue DLV (Delavirdine) und NVP (Nevirap-
5 ine). Weitere Beispiele für geeignete Protease Inhibitoren sind NFV (Nelfinavir), RTV (Ritonavir) und SQV (Saquinavir).

Aus der Literaturstelle WO 98/54225 sind humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche für Human-CD28 spezifisch sind
10 und Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der Human-T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, bekannt. Bezüglich weiterer Hintergrundinformation wird auf die in dieser Literaturstelle genannten Zitate verwiesen. Aus dieser Litera-
15 turstelle ist es auch bekannt, diese monoklonalen Antikörper zur Behandlung von Erkrankungen mit pathologisch erniedrigten CD4-T-Zellzahlen, wie beispielsweise AIDS, zu verwenden. Hintergrund dieser Verwendung ist, daß mittels dieser Antikörper die CD4-T-Zellzahlen wieder angehoben werden können. Eine
20 Verbindung mit der Darreichung von Reverse Transkriptase Inhibitoren und ggf. Protease Inhibitoren ist nicht gezogen. Die Literaturstelle WO 98/54225 wird hiermit ausdrücklich vollumfänglich in Bezug genommen.

25

Aufgabe der Erfindung

Gegenüber dem nächstliegenden Stand der Technik gemäß T.W. Chun et al., Nature Medicine, Volume 5, Number 6, pp.
30 651-655, liegt der Erfindung das technische Problem zugrunde, eine pharmazeutische Zusammensetzung bzw. einen Behandlungsplan zu entwickeln, womit einerseits zumindest der größte Teil der HIV Latenzviren, wenn nicht alle, aktiviert (und damit durch Virus Inhibitoren hemmbar und letztlich

35

zerstörbar gemacht) wird und andererseits die Nebenwirkungen reduziert werden.

5 Grundzüge der Erfindung

Die Erfindung lehrt die Verwendung monoklonaler Antikörper, welche für CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors
10 der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, oder ein Analog hierzu, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung in der Ausführungsform als Präparat oder Präparatepaket zur Behandlung von Virusinfektionen beim Menschen oder niedrigeren Warmblütern, bei welchen T-
15 Lymphozyten infiziert sind, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich einen Virus Inhibitor enthält. Es versteht sich, daß die Wirkstoffkomponenten in pharmazeutisch wirksamen Dosen eingesetzt werden.

20 Die Erfindung lehrt weiterhin eine pharmazeutische Zusammensetzung in einer Ausführungsform als Präparat oder als Präparatepaket, mit pharmazeutisch wirksamen Dosen der folgenden Wirkstoffkomponenten: a) vorzugsweise humanverträglichen monoklonalen Antikörpern, welche für CD28, vorzugsweise
25 Human-CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten, vorzugsweise Human-T-Lymphozyten, mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, oder einem Analog hierzu, b) einem Virus Inhibitor, vorzugsweise einem Reverse Transkription
30 tase Inhibitor, c) optional einem von b) verschiedenen Reverse Transkriptase Inhibitor, d) optional einem Protease Inhibitor, e) optional einem von d) verschiedenen Protease Inhibitor. Neben den vorstehenden Wirkstoffkomponenten können
35 tung zweckmäßige oder notwendige Stoffe enthalten sein.

Die Erfindung lehrt weiterhin eine Paketkomponente eines erfindungsgemäßen Präparatepakets enthaltend die Wirkstoffkomponente a).

5

Die Erfindung lehrt weiterhin ein Verfahren zur Behandlung von Virusinfektionen mit Lentivirus, insbesondere HIV, wobei eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung einem von der Virusinfektion befallenen menschlichen Körper oder
10 einem Körper eines niedrigeren Warmblüters dargereicht wird, bzw. ein Verfahren zur Behandlung von Virusinfektionen mit Lentivirus, insbesondere HIV, wobei einem menschlichen Körper oder einem Körper eines niedrigeren Warmblüters folgende Wirkstoffkomponenten in pharmazeutisch wirksamer Dosis
15 dargereicht werden: a) vorzugsweise humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche für CD28, vorzugsweise Human-CD28, spezifisch sind und T-Lymphozyten, vorzugsweise Human-T-Lymphozyten, mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenun-
20 spezifisch aktivieren, oder ein Analog hierzu, b) ein Virus Inhibitor, vorzugsweise ein Reverse Transkriptase Inhibitor, c) optional ein von b) verschiedener Reverse Transkriptase Inhibitor, d) optional ein Protease Inhibitor, e) optional ein von d) verschiedener Protease Inhibitor.

25

Die Erfindung lehrt schließlich die Verwendung eines vorzugsweise humanverträglichen monoklonalen Antikörpers a), welcher für CD28, vorzugsweise Human-CD28, spezifisch ist und T-Lymphozyten, vorzugsweise Human-T-Lymphozyten, mehrerer bis
30 aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktiviert, oder eines Analogen hierzu, und eines Virus Inhibitors b), vorzugsweise eines Reverse Transkriptase Inhibitors, in Form einer Mischung oder von räumlich getrennten Zusammensetzungen, von
35 denen die eine die Wirkstoffkomponente a) und die andere die

Wirkstoffkomponente b) enthält, als Mittel zur Anwendung bei der Behandlung von Virusinfektionen mit Lentiviren, insbesondere AIDS, bei Menschen oder niedrigeren Warmblütern nach einem Behandlungsplan, der einen oder mehrere Zyklen umfaßt, 5 wobei der Behandlungsplan aus folgenden Schritten besteht: i) zunächst wird die Wirkstoffkomponente b) in einer pharmazeutisch wirksamen Dosis dargereicht, ii) nach einer vorgegebenen Dauer der Stufe i) wird die Wirkstoffkomponente a) in einer pharmazeutisch wirksamen Dosis dargereicht bei fort- 10 fahrender Darreichung der Wirkstoffkomponente b), iii) optional wird Stufe ii) nach einer vorgegebenen Ruhepause bei fortfahrender Darreichung der Wirkstoffkomponente b) einmal oder mehrmals wiederholt. Im Rahmen dieser Verwendung kann der Stufe i) eine Darreichung der Wirkstoffkomponente a) 15 vorgeschaltet sein.

Die Erfindung beruht zunächst auf der Erkenntnis, daß durch die Aktivierung eines Großteils der T-Lymphozyten auch ruhendes (Latenz-) Virus aktiviert und so durch Virus Inhibi- 20 toren, insbesondere Reverse Transkriptase Inhibitoren (und/oder Protease Inhibitoren), zerstörbar gemacht wird. Hieran anschließend beruht die Erfindung auf der weiteren überraschenden Erkenntnis, daß die parallele Anwendung von (toxischen) Reverse Transkriptase Inhibitoren, beispielsweise 25 der (toxischen) HAART Therapie, die Aktivierung der T-Lymphozyten nicht konterkariert. Dies hat im Ergebnis eine doppelte Bedeutung und folglich synergistische Wirkung. Einerseits ist so die Aktivierung des Großteils der T-Lymphozyten trotz paralleler HAART Therapie mit der Folge der 30 Vernichtung praktisch des gesamten Latenzvirus-Reservoirs durch die HAART Therapie gewährleistet. Andererseits wird gleichzeitig die ohnehin pathologisch erniedrigte Anzahl der T-Lymphozyten wieder angehoben mit der Folge einer Stabilisierung des Immunsystems. Hinzu kommt noch, daß mit den er- 35 findungsgemäßen Mitteln vermutlich auch nicht-T-Zell

Reservoirs für Latenzviren (z.B. Makrophagen) indirekt durch die starke generelle Stimulierung des Immunsystems bzw. der T-Zellen mit der entsprechenden Zytokinfreisetzung aktiviert werden und so auch diese Latenzviren aktiviert und zerstört werden können; eine weitere Synergie.

Letztendlich wird erreicht, daß nicht nur das freie Virus praktisch vollständig ausgeschaltet wird, sondern auch praktisch das ganze Latenzvirus Reservoir durch Aktivierung der Zerstörung zugänglich gemacht wird. Dadurch braucht die HAART Therapie nicht mehr lebenslang, zumindest jedoch nur noch in sehr großen Zeitabständen, eingesetzt zu werden. Ein weiterer überraschender Vorteil gegenüber dem nächstliegenden Stand der Technik ist, daß die erfindungsgemäß eingesetzten Antikörper nach ersten Untersuchungen in Tiermodellen keine Nebenwirkungen zu erzeugen scheinen. Insgesamt wird eine wesentlich effektivere Ausschaltung des Virus in Verbindung mit einer beachtlich verbesserten Befindlichkeit des Patienten bereits während der Therapie erreicht.

In diesen Zusammenhängen mag angemerkt werden, daß mit den erfindungsgemäß eingesetzten monoklonalen Antikörpern in der Tat sämtliche CD4 T-Zellen zur Proliferation angeregt werden können. Nur eine Subpopulation von CD8 T-Lymphozyten, die CD28 nicht exprimieren, kann nicht durch aktivierende CD28-spezifische Reagenzien aktiviert werden. Allerdings stellt diese auch kein wesentliches Reservoir von HIV dar, da der primäre Rezeptor für HIV das CD4 Molekül ist.

Definitionen

Als monoklonale Antikörper sind Antikörper bezeichnet, die von Hybrid-Zelllinien (sog. Hybridomen) produziert werden, die durch Fusion einer Antikörper produzierenden B-Zelle

tierischer oder menschlicher Herkunft mit einer geeigneten Myelom Tumorzelle entstanden sind. Im Rahmen dieser Beschreibung sind mit dem Ausdruck der monoklonalen Antikörper auch deren Derivate umfaßt.

5

Als CD28 wird ein auf T-Lymphozyten menschlicher und tierischer Herkunft exprimiertes Zelloberflächenmolekül bekannter Aminosäuresequenz bezeichnet, dem im Rahmen der internationalen "Human Leukocyte Typing Workshops" das Kürzel
10 CD28 gegeben wurde.

Mit Aktivierung von T-Lymphozyten ist die Vermehrung der Stoffwechselaktivität, Vergrößerung des Zellvolumens, Synthese immunologisch wichtiger Moleküle und Eintritt in die
15 Zellteilung (Proliferation) von T-Lymphozyten auf einen äußeren Reiz hin gemeint. Beispielsweise werden diese Vorgänge durch Besetzung des CD28-Moleküls auf T-Zellen durch besondere CD28-spezifische monoklonale Antikörper ausgelöst. Die Aktivierung von T-Lymphozyten mit den beschriebenen
20 Begleiterscheinungen ist Teil der physiologischen Immunreaktion, kann dort aber in pathologischen Situationen außer Kontrolle geraten (lymphoproliferative Erkrankungen), oder unzureichend sein (Immundefizienz).

25 Konstante Komponenten eines Antikörpers sind Bereiche, die nicht für die Antigenerkennung bedeutsam sind, im Gegensatz zu den variablen Bereichen, die die Antigenspezifität eines Antikörpers definieren. Konstante Komponenten unterscheiden sich jedoch bei Antikörpern verschiedener Arten und folglich
30 auch Tieren und Menschen. Die konstanten Bereiche eines Antikörpers müssen jenen von Antikörpern eines Organismus entsprechen, der mit den Antikörpern behandelt werden soll, um verträglich zu sein.

Unter Derivaten von monoklonalen Antikörpern sind Modifikationen des monoklonalen Antikörpers zu verstehen, die durch übliche biochemische oder gentechnische Manipulationen erzeugt wurden. Dies ist beispielsweise gegeben mit der Humanisierung eines monoklonale Antikörpers der Maus durch partiellen Ersatz struktureller (konstanter) Komponenten des Maus-Antikörpers durch solche eines menschlichen. Derivate sind weiterhin monoklonale Antikörper, welche zwar chemisch verändert sind, jedoch dennoch die im Rahmen der Erfindung erläuterten Funktionen ausüben. Gemeinsames Kriterium ist stets die CD28 Spezifität mit stimulatorischem Effekt.

Analoge sind Substanzen, die keine monoklonalen Antikörper sind, jedoch die im Rahmen der Erfindung erläuterten Funktionen ausüben. Beispiele hierfür sind "geschneiderte" hochspezifische synthetische Proteine oder RNA bzw. DNA Moleküle (z.B. Aptamere, insbesondere gegen Nukleinsäurespaltende Enzyme stabilisierte Aptamere bzw. RNA oder DNA Moleküle). Gemeinsames Kriterium ist stets die CD28-Spezifität mit stimulatorischem Effekt.

Unter einer Determinante ist der Bereich eines Moleküls zu verstehen, der durch die Bindungsspezifität eines oder mehrerer Antikörper definiert wird.

25

Der Ausdruck der therapeutisch aktiven Dosis bezeichnet im Zusammenhang mit Virus Inhibitoren, beispielsweise Reverse Transkriptase Inhibitoren (und ggf. Protease Inhibitoren), eine Dosis, die zu einer signifikanten Verringerung der Menge an replikationsfähigem Virus ab einem definierten Zeitraum nach Darreichung der Virus Inhibitoren an einen Patienten oder in einem Testsystem führt, verglichen mit der Menge an replikationsfähigem Virus nach gleichem Zeitraum und gleicher Anfangsmenge an replikationsfähigem Virus, jedoch ohne irgendeine Darreichung.

35

Der Ausdruck der therapeutisch aktiven Dosis bezeichnet im Zusammenhang mit erfindungsgemäß eingesetzten Antikörpern eine Dosis, die zu einer signifikanten Erhöhung der CD4 T-Zellzahlen und/oder der Expression von serologisch nachweisbaren Aktivierungsmarkern (CD25, CD45R0, CD71) nach einem definierten Zeitraum in einem Organismus oder Testsystem, welchem die Antikörper dargereicht wurden, verglichen mit respektiven Werten nach gleichem Zeitraum und gleicher Anfangswerte, jedoch ohne irgendeine Darreichung.

Humanverträglich bezeichnet Antikörper, welche humanisiert sind. Es mag hier angemerkt werden, daß nicht humanisierte und folglich nicht unter die hier getroffene Definition der humanverträglichen Antikörper fallende Antikörper durchaus zur Therapie beim Menschen angewandt werden können. Bei der Therapie des Menschen können insofern alle Antikörper eingesetzt werden, welche über einen bestimmten Zeitraum keine unerwünschten Immunreaktionen auslösen, wie beispielsweise durch Bestimmung von anti-Immunglobulin Antikörper als Abbruchkriterium nachweisbar.

Als Virus Inhibitor ist jeder Wirkstoff bezeichnet, welcher in eine beliebige Stufe des Lebenszyklus eines Virus direkt oder indirekt hemmend eingreift. Hierfür kommen neben Reverse Transkriptase Inhibitoren und Protease Inhibitoren beispielsweise auch Inhibitoren der Zelloberflächenrezeptoren in Frage, an welche ein Virus andockt, oder Inhibitoren aller positiv regulatorischen Proteine bzw. Prozesse eines Virus, einschließlich Inhibitoren zellulärer positiv regulatorischer Substanzen, welche auf die long terminal repeats eines Virus wirken. Grundsätzlich kommen auch Wirkstoffe in Frage, welche keine Inhibitoren sind, sondern negativ regulatorische Proteine bzw. Prozesse eines Virus induzieren; solche Wirkstoffe sind von dem Ausdruck Virus Inhibitor ebenfalls umfaßt.

Der Begriff der kontinuierlichen Darreichung einer Wirkstoffkomponente b) und/oder c) und/oder d) und/oder e) meint, daß ein zu dieser Komponente anzuwendender (in sich ggf. diskontinuierlicher) Behandlungsunterplan kontinuierlich fortgeführt wird. Insofern schließt der Ausdruck der kontinuierlichen Darreichung beispielsweise bei der HAART Therapie auch ein Variation und individuelle Anpassung der Wirkstoffkomponenten bzw. deren Dosierung in Verfolg der kontinuierlichen Darreichung ein.

10

Detaillierte Darstellung der Erfindung

Folgend werden zweckmäßige oder bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung angegeben und näher erläutert.

Bevorzugt ist die erfindungsgemäße Verwendung zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, wobei CD4 T-Lymphozyten, insbesondere Human-CD4 T-Lymphozyten, infiziert sind, wobei die monoklonalen Antikörper für Human-CD28 spezifisch sind und wobei die monoklonalen Antikörper optional humanverträglich sind. Bei der Behandlung von Infektionen von Human-CD4-Lymphozyten, also des Menschen, müssen die Antikörper Human-CD28 spezifisch sein, nicht jedoch notwendigerweise humanverträglich. Die Erfindung ist beispielsweise anwendbar, wenn die Virusinfektion eine Infektion mit Retrovirus, insbesondere Lentivirus, beispielsweise HIV, ist.

Zweckmäßig ist es, wenn der Virus Inhibitor ein Reverse Transkriptase Inhibitor, vorzugsweise ein Pyrimidin-Nukleosidanalogue, höchstvorzugsweise 3'-Azido-3'-desoxythymidin (AZT oder Zidovudin), ist und optional weiterhin zusätzlich andere hiervon verschiedene Nukleosidanalogue, vorzugsweise 3TC, in der pharmazeutischen Zusammensetzung ent-

35

halten sind. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann zusätzlich einen Proteaseinhibitor enthalten und optional weiterhin zusätzlich andere, hiervon verschiedene Proteaseinhibitoren. Mit einer Wirkstoffkombination aus zumindest zwei
5 Reverse Transkriptase Inhibitoren und optional zumindest einem Protease Inhibitor arbeitet die HAART Therapie.

Erfindungsgemäß eingesetzte monoklonale Antikörper sind auf die verschiedensten Weisen erhältlich. Eine verwendbare Aus-
10 führungsform gemäß der Ausführungsbeispiele ist erhältlich sind durch A) Herstellung von zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybrido-
domzellen im Wege einer Immunisierung mit nicht-T-Tumorzelllinien, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist, B)
15 ggf. Humanisierung der aus Hybridomzellen gemäß Stufe A erhältlichen monoklonalen Tier-Antikörper durch biochemischen oder gentechnologischen Austausch konstanter Komponenten der Tierantikörper gegen analoge konstante Komponenten eines menschlichen Antikörpers bzw. Austausch den Komponenten ent-
20 sprechender Gene der Hybridomzellen, C) Sezernierung der monoklonalen Antikörper in Hybridomzell-Kulturen und Isolierung der monoklonalen Antikörper daraus oder Produktion der monoklonalen Antikörper durch Injektion der Hybridomzellen in Tiere, beispielsweise Mäuse, und Isolierung der monoklonalen Antikörper aus der Körperflüssigkeit der Tiere. Die
25 zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen sind erhältlich durch a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pHSApr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII
30 Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen, b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol, c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen, d) Screenen der
35 transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die

Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen, e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen, f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol, g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zellen binden und h) Kultivierung/Subclonierung der in Stufe g erhaltenen selektierten Hybridomzellen. Anstelle der Stufen a) bis d) können selbstverständlich aber auch andere dem Fachmann geläufige Expressionssysteme eingesetzt werden. Human-CD28 cDNA ist frei erhältlich von Dr. A. Aruffo und Dr. B. Seed, die die Sequenz und auch folgende Literaturstelle veröffentlicht haben: Aruffo, A., and Seed, B, 1987, "Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high efficiency COS cell expression system", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8573. Dieser Literaturstelle ist daher im einzelnen die Herstellung der Human-CD28 cDNA entnehmbar. Darüberhinaus kann unschwer jeder Fachmann mit Hilfe der in der Genbank deponierten Sequenz und der Polymerasekettenreaktion sehr einfach und schnell einen Human-CD28 cDNA Klon herstellen. Der pHBAPr-1-neo Vector ist frei erhältlich von den Autoren der Literaturstelle Gunning, P, et al., 1987, "A human β -actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4831. "neo" steht dabei für Neomycin-Resistenz. Die Stufe c) wird daher in Anwesenheit von Neomycin durchgeführt. Die vorstehend angesprochenen Zelllinien und/oder Mikroorganismen sind frei verfügbar und käuflich erwerbbar bei der American Type Culture Collection (ATCC). Bezüglich Escherichia coli (MC1061) wird ergänzend auf die Literaturstelle Meissner, P.S., et al., 1987, "Bacteriophage gamma cloning system for

the construction of directional cDNA libraries", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4171, verwiesen.

- Die grundsätzliche Vorgehensweise bei der Herstellung von
- 5 Hybridomzellen, bei der Humanisierung sowie bei der Produktion der monoklonalen Antikörper aus (humanisierten) Hybridomzellen ist dem Fachmann gut vertraut und braucht hier nicht näher erläutert zu werden. Grundsätzlich sind alle insbesondere für die Herstellung der Hybridomzellen üblichen,
- 10 bekannten und frei verfügbaren Zelllinien einsetzbar. Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper kommt grundsätzlich neben der folgend beschriebenen Vorgehensweise die dem Fachmann im Detail gut geläufige rekombinante Expression in Frage.
- 15 Einsetzbare monoklonale Antikörper sind aber auch auf anderen Wegen zugänglich. So kann beispielsweise die Immunisierung in Stufe A) gegen lösliches bzw. gelöstes rekombinantes Human-CD28 erfolgen. Die Humanisierung kann entbehrlich gemacht werden, indem bei der Herstellung der Hybridomzellen
- 20 Tiere eingesetzt werden, die gentechnisch so verändert sind, daß die gebildeten Antikörper bereits die humanen konstanten Komponenten aufweisen. Ein völlig anderer Ansatz zur Herstellung monoklonaler Antikörper besteht darin, daß die Antigen-Bindungsdomänen (z.B. menschlicher) Antikörper in einer
- 25 hochkomplexen Bakteriophagen-Bibliothek gentechnisch exprimiert werden, aus welcher geeignete Bindungsdomänen durch ihre Affinität für CD28 isoliert und zu vollständigen Antikörpern ergänzt werden können.
- 30 Hinsichtlich der pharmazeutischen Zusammensetzung können die Wirkstoffkomponenten b) bis e) entsprechend der HAART Therapie ausgewählt, dosiert und darreichungsfertig hergerichtet sind. Grundsätzlich sind alle bestehenden und zukünftig entwickelten Varianten der HAART Therapie oder einer anderen
- 35 Therapie brauchbar, solange nicht durch eine oder mehrere

Wirkstoffkomponenten die aktivierende Wirkung der monoklonalen Antikörper (über-) kompensiert wird. Im Rahmen derzeitiger Therapieansätze ist oft erfolgversprechend, wenn die Wirkstoffkomponente b) ein Pyrimidin-Nukleosidanalogs, vorzugsweise 3'-Azido-3'-desoxythymidin, ist und/oder die Wirkstoffkomponente c) 3TC ist, und/oder die Wirkstoffkomponente d) zwingend eingerichtet ist. In Hinblick auf eine Variante eines erfindungsgemäßen Behandlungsplans kann es zweckmäßig sein, wenn die Wirkstoffkomponenten b) bis e) Bestandteil einer ersten Paketkomponente und die Wirkstoffkomponente a) Bestandteil einer zweiten Paketkomponente sind.

Bei der Anwendung der Erfindung in einem Behandlungsverfahren können die Wirkstoffkomponenten b) bis e) entsprechend der HAART Therapie ausgewählt, dosiert und dargereicht werden, wobei die Wirkstoffkomponente a) vor, zusammen oder nach den Wirkstoffkomponenten b) bis e) dargereicht werden. Im einzelnen können die Wirkstoffkomponenten b) bis e) kontinuierlich und die Wirkstoffkomponente a) einmal oder mehrmals in zeitlichen Abständen mit Ruhepausen, dargereicht werden. Die Wirkstoffkomponente b) kann ein Pyrimidin-Nukleosidanalogs, vorzugsweise 3'-Azido-3'-desoxythymidin, und/oder die Wirkstoffkomponente c) kann 3TC, und/oder die Wirkstoffkomponente d) kann zwingend eingerichtet sein.

Im Rahmen eines erfindungsgemäßen Behandlungsplans kann die Darreichung der Wirkstoffkomponente b) im Rahmen eines Behandlungsunterplans erfolgen, welcher die HAART Therapie ist. Zunächst erfolgt die HAART Grundtherapie über eine Dauer von 1 bis 12 Monate, vorzugsweise 2 bis 6 Monate, höchstvorzugsweise 2 bis 4 Monate, beispielsweise 3 Monate (1 Monat = 30 Tage). Während dieser Zeit können CD4 T-Zellzahlen und/oder Virusbelastung und/oder Latenzvirus (beispielsweise gemäß der Literaturstelle T.W. Chun et al., Nature, 387:183-188

(1997)) regelmäßig überprüft werden und kann auf Basis dieser Ergebnisse die HAART Therapie individuell auf den Patienten angepaßt werden (durch Wahl bzw. Austausch und Kombination der Reverse Transkriptase Inhibitoren und/oder der Protease Inhibitoren sowie der jeweiligen Dosierungen). In einem ersten Zyklus kann dann eine vorzugsweise i.v. Injektion von Antikörpern in einer Dosierung von 0,1 bis 50, vorzugsweise 0,5 bis 20, höchstvorzugsweise 0,5 bis 5 mg/kg Körpergewicht erfolgen unter Aufrechterhaltung der HAART Therapie. Die vorstehende Dosis kann auf einmal oder in 2 bis 10, vorzugsweise 2 bis 5, Teilmengen über einen Zeitraum von 1h bis 1 Monat, vorzugsweise 1 Tag bis 5 Tage, gleichmäßig oder ungleichmäßig verteilt verabreicht werden. In einer hieran anschließenden Ruhepause (unter Aufrechterhaltung von HAART) von 1 Tag bis 6 Monaten, vorzugsweise 0,5 bis 2 Monaten, beispielsweise 1 Monat, kann eine Überwachung der vorstehend zur Grundtherapie genannten Werte und/oder des Blutbildes und/oder der Blutwerte und/oder klinisch internistischer Befunde und/oder der Bildung von anti-Immunglobulin Antikörpern (anti-Tier Ig bei nicht humanisierten Antikörpern, anti-idiotypisch nach Humanisierung) erfolgen. Nach Ablauf der Ruhepause kann bei Bedarf der Zyklus beginnend mit der Darreichung des Antikörpers wiederholt werden. Wenn PBMC (Lymphozyten plus Monozyten) virus- und latenzvirus- bzw. provirusfrei sind, kann bei Einverständnis des Patienten eine Lymphknotenbiopsie zur Verifizierung durchgeführt werden. Bei positivem Ergebnis (positiv = Detektion von Virus bzw. Latenzvirus bzw. Provirus) können weitere Zyklen der vorstehend beschriebenen Art angeschlossen werden. Bei negativem Ergebnis kann die Darreichung von HAART Wirkstoffen und von Antikörpern abgesetzt werden. Es empfiehlt sich, nach Absetzung weiter Kontrolluntersuchungen der vorstehenden Art in bestimmten zeitlichen Abständen durchzuführen, um ggf. die Behandlung wieder aufzunehmen. Die vorstehenden Ausführungen gelten entsprechend für ein Behandlungsverfahren.

Eingesetzt werden können im Rahmen der Erfindung beispielsweise der monoklonale Antikörper CMY-2, erhältlich aus Hybridomzellen gemäß Hinterlegung DSM ACC2353, oder der
5 käuflich von der Firma ALEXIS Deutschland GmbH, D-35305 Grünberg, erhältliche und von der Firma Ancell Corporation, USA, hergestellte Klon ANC28.1/5D10 oder eine vorzugsweise humanisierte bzw. humanverträgliche Variante des Klons ANC28.1/5D10.

10

Erfindungsgemäß eingesetzte monoklonale Antikörper können insbesondere Spezifität für Determinanten des menschlichen CD28-Moleküls aufweisen, die auf dem natürlicherweise exprimierten CD28-Molekül schwer zugänglich sind und deren Be-
15 setzung durch die monoklonale Antikörper zur Aktivierung der T-Zellen führt.

Die galenische Herrichtung von Wirkstoffkomponenten oder von Mischungen daraus für die verschiedenen Verabreichungsformen
20 ist dem Fachmann gut bekannt und braucht hier nicht näher erläutert zu werden.

Zu einer Anspruchskategorie getroffene Erläuterungen gelten für die Gegenstände der anderen Anspruchskategorien
25 entsprechend.

Im Rahmen der Erfindung können optional noch zusätzliche Wirkstoffe präsent sein oder verwendet werden, welche von den vorstehend genannten und gemäß der Grundkonzeption der Er-
30 findung eingesetzten Wirkstoffen verschieden sind. Solche zusätzliche Wirkstoffe sind beispielsweise Wirkstoffe, welche eventuellen Nebenwirkungen entgegenwirken. Lediglich beispielhaft seien anti-TNF-Antikörper (TNF = Tumor Nekrose Faktor) im Falle einer proinflammatorischen TNF Reaktion
35 genannt. Zusätzliche Wirkstoffe sind weiterhin Wirkstoffe,

welche im Zusammenhang mit der Expansion des Immunsystems hilfreich sein können. So kann beispielsweise durch Gabe von IL-2 die Proliferation von CD8-Zellen induziert bzw. verstärkt werden. Generell können als zusätzliche Wirkstoffe
5 immunmodulierende Wirkstoffe eingesetzt werden nach Maßgabe des immunologischen (Detail- bzw. Neben-) Prozesses welcher im Zusammenhang mit der Erfindung zweckmäßigerweise gefördert (oder gehemmt) wird. Beispiel hierfür sind Oligonukleotide enthaltend CpG Motive (D. Klinman et al., Proc. Natl. Acad.
10 Sci. USA, 93:2879-2883 (1996)).

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. U.a. wird die Herstellung erfindungsgemäß eingesetzter monoklonaler Antikörper beschrieben.
15 In diesen Ausführungsbeispielen werden auch Screeningverfahren im einzelnen deutlich, mit welchen erfindungsgemäße monoklonale Antikörper bzw. zugrundeliegende Hybridomzellen selektiert werden können. Aus den folgenden Beispielen werden auch die therapeutischen Wirkungen
20 deutlich.

Beispiel 1: Herstellung und Wirkung eines ersten erfindungsgemäß verwendbaren monoklonalen Antikörpers.

25 1.1 Allgemeine Informationen.

Die dargestellten Experimente bzw. die Beispiele zu den Wirkungen von "direkten" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpern wurden im Tiermodell der Ratte durchgeführt, wobei
30 als Beispiel für einen "klassischen" CD28-spezifischen Antikörper der monoklonale Antikörper JJ319 und als Beispiel für einen "direkt" aktivierenden der monoklonale Antikörper JJ316 eingesetzt wird. Beide Antikörper sind frei verfügbar und käuflich erwerbbar von der Firma Pharmingen, San Diego,
35 USA. JJ319 und JJ316 Antikörper sind im übrigen erhältlich

gemäß der Literaturstelle M. Tacke et al., Immunology, 1995, 154: 5121-5127, auf welche hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird, auch im Hinblick auf Details der Herstellung von Hybridomzellen und monoklonalen Antikörpern.

5

1.2: Herstellung monoklonaler Antikörper

In diesem Beispiel wird die Herstellung erfindungsgemäßer, d.h. human-CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper näher erläutert. Diese werden folgend auch als CMY-2 bezeichnet. Human CD28 aus einer cDNA Bibliothek wurde in A20J und/oder L929 Zelllinien rekombinant exprimiert. Zunächst wurde hierzu ein Plasmid mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pHßAPr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments geschaffen. Aus Escherichia coli (MC1061) wurden Protoplasten hergestellt, welche das Plasmid tragen. Dann erfolgte eine Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol. Die so erhaltenen transfektierten Zellen wurden auf übliche Weise kultiviert. Anschließend erfolgte ein Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen.

25

Der Nachweis der erfolgreichen Expression erfolgte mit Hilfe eines konventionellen, kommerziell erhältlichen fluoreszenzmarkierten Antikörpers mit Spezifität für Human CD28 (9.3-Phykoerythrin). Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte A20J- bzw. L929-Zellen mit dem gleichen Antikörper gefärbt. Die Transfektanten (A20J-CD28 und L929-CD28) zeigten eine höhere Fluoreszenzintensität. Da nicht alle Zellen CD28 positiv waren, wurden CD28-positive Zellen subkloniert und zur Immunisierung verwendet. Wie in Fig. 1 an der Verschiebung der Punktwolken nach oben in den beiden rechten

35

Diagrammen erkennbar, reagierten diese Zellen mit dem käuflichen Antikörper, drückten also Human CD28 an ihrer Oberfläche aus.

- 5 Die A20J Human-CD28 Zelllinie wurde zur Immunisierung von BALB/c Mäusen verwendet. Zellfusion und screening wurden wie folgt durchgeführt: i) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J Zellen (Injektionen 6 x i.p. und anschließend 1 x i.v.). ii) Entnahme von
- 10 Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol. iii) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28
- 15 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zellen binden.

Als read-out diente die Anfärbung einer Mischung aus CD28 transfizierten und untransfizierten Maus L929 Tumorzellen. Fig. 2 zeigt, daß der auf diesem Weg isolierte monoklonale

20 Antikörper CMY-2 transfizierte und untransfizierte Zellen durch unterschiedliche Fluoreszenzintensität unter- scheidet. Das differentielle Screening auf Antikörper gegen Human-CD28 erfolgte wie folgt. Je 50 Öl Überstand von kultivierten Zellhybridomen wurden entnommen und mit einem

25 Gemisch aus L929-Zellen und L929-CD28-Transfektanten 15 min inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit DaMIg-PE angefärbt. Teil A zeigt die Negativkontrolle. Die Zellen wurden nur mit DaMIg-PE inkubiert. Teil B zeigt die Färbung mit einem Überstand, der leicht positiv war, aber keinen

30 Unterschied bei beiden Zellen zeigt. Teil C zeigt die mit einem Überstand von CMY-2 gefärbten Zellen.

In nicht dargestellten Experimenten wurden periphere Blutzellen des Menschen mit dem neu isolierten CMY-2 und dem

35 "klassischen" CD28-spezifischen Antikörper 9.3 gefärbt. Es

wurde ein identisches Expressionsmuster auf den Subpopulationen menschlicher Blutzellen gefunden.

Zusammengefaßt zeigen die Experimente, daß CMY-2 ein human
5 CD28-spezifischer Antikörper ist.

CMY-2 wurde sodann mit aus peripherem Blut auf circa 80 %
angereicherten menschlichen T-Lymphozyten auf klassische
kostimulierende und auf "direkt" stimulierende Aktivität
10 getestet. Die T-Zellproliferation wurde durch Einbau von
³H-Thymidin zwischen dem 2. und 3. Tag der Kultur gemessen.
Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

15 Kostimulation:

Unstimulierte Zellen	276 cpm
CD3-spezifischer Antikörper	3111 cpm
CD3-spezifischer Antikörper + CMY-2	51676 cpm

20 Direkte Stimulation:

Solid-phase anti-mouse Ig	379 cpm
Solid-phase anti-mouse Ig + Kontroll-mAk	258 cpm
Solid-phase anti-mouse Ig plus CMY-2	19115 cpm

25 Zur Erläuterung: Anti-CD3 sorgt für T-Zellrezeptor-
Stimulation (CD3 ist Teil des TCR-Komplexes). CMY-2 wurde in
Form eines nicht aufgereinigten Kulturüberstandes (50%
Endvolumen) verwendet. Erfahrungsgemäß ist die dabei zu
erwartende effektive mAk-Konzentration suboptimal für eine
30 direkte Aktivierung, aber ausreichend für die Kostimulation.
Das Experiment zeigt, daß CMY-2 direkt aktivierende
Eigenschaften hat.

Hybridomzellen, welche CMY-2 produzieren, sind bei der DSMZ,
35 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,

Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, unter der Nummer DSM ACC2353 (20.05.1998) hinterlegt worden.

1.3 Proliferative Antwort auf den Antikörper aus 1.2.

5

Fig. 3 zeigt die proliferative Antwort ungetrennter Lymphknotenzellen der Ratte auf den "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper (JJ316) und das Ausbleiben einer solchen Antwort bei Einsatz eines

10 "klassischen " CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpers (JJ319). Die Zellen wurden zwei Tage lang in 0,2 ml Medium (RPMI 1640, erhältlich von GIBCO/BRL, enthaltend 5 % FCS [fetal calf serum]) in An- oder Abwesenheit der angegebenen Zusätze bei einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro ml im begasten
15 Brutschrank kultiviert. Die Zellteilungsaktivität wurde durch den Einbau radioaktiv markierten Thymidins (1 μ Ci/Ansatz für 16 Std., 1Ci = 37GBq, Bestimmung mit β -Detektor) bestimmt.

Im Gegensatz zu veröffentlichten Resultaten (Siefken et al.,
20 Cellular Immunology, 1997, 176: 59-65) zeigt dieses Ergebnis, daß es für die T-Zell-Aktivierung durch direkt aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper nicht notwendig ist, diese artifiziell durch einen zweiten Antikörper miteinander zu vernetzen. Vielmehr reicht die Anwesenheit von nicht-T-
25 Zellen aus lymphoiden Organen, nämlich von B-Lymphozyten und sogenannten akzessorischen Zellen, um eine direkte Aktivierung durch löslich zugegebene CD28-spezifische monoklonale Antikörper zu ermöglichen. Wahrscheinlich geschieht dies durch Bindung der monoklonale Antikörper an sogenannte
30 Fc-Rezeptoren dieser nicht-T-Zellen. Dieses Ergebnis ist eine wichtige Voraussetzung für den therapeutischen Einsatz "direkt" stimulierender CD28-spezifischer monoklonale Antikörper, in dem eine artifizielle Vernetzung mit anti-Immun-

globulin Antikörpern im Gesamtorganismus nicht praktikabel ist.

"Direkt" aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper
5 führen zu einer Erhöhung der CD4 T-Zellzahl im intakten
Organismus. Fig. 4 zeigt dies für Lymphknoten der Ratte, die
am Tag 0 1 mg des "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen
monoklonale Antikörpers (JJ316) oder des "klassischen" CD28-
spezifischen monoklonalen Antikörpers (JJ319) erhalten
10 hatten. Mit erfindungsgemäßen direkt aktivierenden mono-
klonalen Antikörpern mit Spezifität für Human-CD28, und deren
Fähigkeit, die Vermehrung von T-Lymphozyten zu stimulieren,
werden ganz analoge Effekte erreicht. Im vorliegenden
Beispiel ist die CD4 T-Zellzahl nur vorübergehend erhöht; das
15 liegt daran, daß gesunde Tiere mit normalen CD4 T-Zellzahlen
behandelt wurden. Die aufgrund der Proliferationsstimulierung
"überschüssigen" Zellen werden durch homöostatische
Mechanismen abgebaut.

20 Die vorstehend im einzelnen erläuterten Ergebnisse zeigen,
daß eine Aktivierung der T-Lymphozyten erfolgt, und zwar ohne
die Notwendigkeit weiterer Wirkstoffe.

25 Beispiel 2: Verwendung erfindungsgemäß eingesetzter Antikör-
per in Verbindung mit der HAART Therapie

2.1: Allgemeine Informationen.

30

In den folgend beschriebenen Versuchen wurde anstelle des in
Beispiel 1 beschriebenen monoklonalen Antikörpers der An-
tikörper Klon ANC28.1/5D10 der Firma Ancell Corporation, USA,
vertrieben von der Firma ALEXIS Deutschland GmbH, Giessener
35 Str. 12, D-35305 Grünberg, eingesetzt. Von diesen Antikörpern

ist bekannt, daß sie in CD28 positiven Zellen IL-2 induzieren. Eine proliferationsinduzierende Aktivität dieses Antikörpers ist jedoch bislang nicht beschrieben worden. Dieser Antikörper wird folgend kurz als "aCD28" bezeichnet. In den
5 folgenden Versuchen wird zu Vergleichszwecken ein monoklonaler Antikörper verwendet, welcher nicht "direkt" stimulierend ist, nämlich CD28.2.

Die Versuche wurde, sofern nicht anders angegeben, in humanen
10 PBL oder in PBL von Rhesusaffen durchgeführt. Dieser Zellkulturansatz kommt der Situation im Gesamtorganismus nahe, weil der stimulierende Antikörper, wie für eine Therapie vorgesehen, in löslicher Form zugesetzt wird.

15 Bei allen Proliferationsexperimenten wurde gemessen durch einen Puls von 1µCi ³H-Tymidin für 16 Stunden zwischen Tag 3 und Tag 4 und Detektion mittels β-Detektor.

Sofern nicht anders angegeben wurden Zellen in 0,2 ml Medium
20 (RPMI 1640, erhältlich von GIBCO/BRL, enthaltend 5% menschliches AB Serum) bei einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro ml im begasten Brutschrank kultiviert.

2.2: Induktion von T-Zellproliferation in peripheren Blut-
25 Lymphozyten und/oder Monozyten (PBMC) durch aCD28.

In der Fig. 5 sind Versuche zum Maß der Aktivierung der Proliferation von CD4 T-Zellen dargestellt. Der Nachweis erfolgte durch Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie
30 (FACS) am Tage vier nach Stimulation der Zellen in vitro. Fig. 10a zeigt sogenannte "dotplots", wobei durch ein Gate (R2) die CD4 T-Zellen definiert werden (sie exprimieren CD3 und CD4). In der Fig. 10b ist in einem Histogramm die Anfärbung dieser CD4 T-Zellen mit einem monoklonalen Antikörper
35 gegen den Transferinrezeptor (CD71) dargestellt. Die

Expression dieses Oberflächenrezeptors charakterisiert proliferierende Zellen. Man erkennt, daß in einem Großteil, nämlich >90%, der CD4+ T-Lymphozyten die Proliferation durch aCD28 (direkt) induziert wird. Die Untersuchungen erfolgten mit 5 µg/ml aCD28.

In der Fig. 6 sind entsprechende Darstellungen, jedoch ohne Stimulation, als Negativkontrollen gezeigt.

10

2.3: Vergleich der Stimulation der Proliferation von ungetrennten PBMC durch aCD28 und IL-2.

Die Figur 7 zeigt, daß die Proliferation ungetrennter PBMC von nicht infizierten menschlichen Spendern, gemessen am Einbau ³H-markierten Tymidins, durch aCD28 stärker ist als durch IL-2. Dies zeigt, daß mehr Zellen mittels aCD28 angesprochen werden als bei der in vivo Therapie mit HAART und IL-2 gemäß dem Stand der Technik. Die Kultivierung erfolgte in Gegenwart von 5 µg/ml aCD28 bzw. 20 I.U./ml IL-2 in 96-well Rundboden Platten.

Wichtig ist darüber hinaus, daß IL-2 präferentiell CD8T-Lymphozyten zur Proliferation stimuliert, während durch aCD28 besonders CD4 T-Zellen angesprochen werden. Dies ist aus den Daten der Tabelle I ersichtlich: PBMC eines HIV infizierten Patienten wurden drei oder 10 Tage mit IL-2 bzw. aCD28 stimuliert. Durch IL-2, nicht aber durch aCD28 erfolgte eine deutliche Verschiebung zu Gunsten der CD8 T-Zellen.

30

Tabelle I

	nach 3 Tagen		nach 10 Tagen	
35	%CD4	%CD8	%CD4	%CD8

Medium	51	49	50	50
IL-2	46	54	27	73
aCD28	57	43	62	38

5

2.4: Stimulation der Proliferation von PBMC aus Virus-infizierten Organismen.

Figur 8A zeigt die aktivierende Wirkung von aCD28 auf die Proliferation von PBMC aus HIV-1 infizierten Personen, Figur 8B Entsprechendes für PBMC aus SIV-infizierten Rhesusaffen. Eingesetzt wurde eine Menge von 5µg/ml aCD28. In allen Fällen konnte starke Proliferation induziert werden, die bei massiver HIV-Infektion jedoch am geringsten ausfiel. Dies hängt vermutlich mit der damit einhergehenden massiven Induktion der Virusvermehrung und damit einhergehender T-Zellzerstörung zusammen, die bei erfindungsgemäßer Behandlung bei gemeinsamer Darreichung von HAART Wirkstoffen vermieden wird (siehe auch Beispiel 2.6a und Fig. 10).

20

2.5: Aktivierung der Proliferation in Gegenwart von HAART-Wirkstoffen.

PBLs einer HIV-1 infizierten Person wurden nicht, mit HAART Wirkstoffen (Zidovudine + Didanosine + Saquinavir; 0,1µM) allein, mit aCD28 (5µg/ml) allein oder mit beidem behandelt. Nach 6 Tagen wurde die Proliferation gemessen.

Mann erkennt in der Figur 9, in welcher die Ergebnisse dargestellt sind, daß die Induktion der Proliferation mittels aCD28 durch Anwesenheit von HAART nicht berührt ist.

35

2.5a Förderung der CD28-, nicht jedoch der IL-2-induzierten T-Zellproliferation.

PBMC eines HIV-1 infizierten Patienten wurden wie vorstehend
5 beschrieben stimuliert. Die Proliferation wurde von Tag 3 zu
Tag 4 gemessen. Wie bei infizierten Patienten bisweilen beobachtet, induziert IL-2 eine stärkere Proliferation als CD28, die jedoch vorwiegend die nicht HIV belasteten CD8 T-Zellen betrifft (siehe Tabelle I). Diese wird nicht durch HAART be-
10 influßt, während die aCD28-induzierte durch HAART verbessert wird. (siehe Fig. 10)

2.6: Einfluß von aCD28/HAART auf die Virusreplikation.

15

Untersucht wurde die Virusreplikation in PBMC von HIV-1 infizierten Personen. In Wochenabständen wurde freier Überstand mittels ELISA auf die Gegenwart von p24Gag (Virusprotein) untersucht. HAART wurde wie in Beispiel 2.5 verwendet. "+"
20 bedeutet hier und folgend Einsatz der betreffenden Wirkstoffkomponente, "-" Abwesenheit. Man erkennt in der Fig. 11, daß die aCD28 Stimulation auch eine massive Virusproduktion induziert. Bei gleichzeitiger HAART ist die Virusproduktion jedoch vollständig unterdrückt. PHA ist
25 Phytohämagglutinin zum Vergleich.

2.7: Verlust der HIV-1 Produktion nach Behandlung mit aCD28 und HAART.

30

In der Figur 12 sind Ergebnisse einer Versuchsreihe dargestellt, wobei PBMC von einer HIV-1 infizierten Person bis zum Tag 6 gemäß der Tabelle behandelt wurden. Vom Tag 6 bis zum Tag 9 erfolgte eine reine HAART Behandlung, gefolgt
35 von einer Behandlung mit aCD28 (auch ComMCD28 genannt) vom

Tag 9 bis zum Tag 14. Die Ergebnisse bestätigen jene aus Beispiel 2.7, da demgemäß auch nach erneuter Stimulation von Zellkulturen HIV-infizierter PBMC nach Beendigung der HAART Therapie keine Virusproduktion beobachtet wird.

5

2.8: Verlust auch proviraler HIV DNA nach Behandlung mit aCD28 und HAART.

10 PBMC welche von einer HIV-1 infizierten Person isoliert wurden, wurden entsprechend der Tabelle kultiviert und in vitro behandelt (Wirkstoffe und Wirkstoffmengen wie in Beispiel 2.5). Am 11. Tag der Kultivierung wurde eine HIV-1 spezifische DNA-PCR durchgeführt:

15

a) extern; primer:

JA4(gag1319-1338): gaa ggc ttt cag ccc aga ag

JA7(gag1615-1596): tct cct act ggg ata ggt gg

Annealing Temp.: 47°C; 42 Zyklen

20

b) nested; primer:

JA5(gag1446-1465): acc atc aat gag gaa gct gc

JA6(gag1577-1558): tat ttg ttc ctg aag ggt ac

Annealing Temp.: 45°C; 25 Zyklen.

25

In der Figur 13 hierzu erkennt man, daß provirale HIV DNA bei kombinierter Behandlung mit HAART und erfindungsgemäß eingesetzten monoklonalen Antikörpern nicht mehr nachweisbar ist, während in den anderen Fällen der Tabelle stets provirale HIV
30 DNA präsent war. Dies demonstriert in einem der Situation des Gesamtorganismus sehr nahe kommenden Testsystem die erfolgreiche Zerstörung auch des Reservoirs an proviralen Strukturen durch die Erfindung.

35

Patentansprüche:

1. Verwendung monoklonaler Antikörper, welche für CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, oder eines Analogen hierzu zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung in der Ausführungsform als Präparat oder Präparatepaket zur Behandlung von Virusinfektionen beim Menschen oder niedrigeren Warmblütern, bei welchen T-Lymphozyten infiziert sind, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich einen Virus Inhibitor enthält.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei CD4 T-Lymphozyten, insbesondere Human-CD4 T-Lymphozyten infiziert sind, wobei die monoklonalen Antikörper für Human-CD28 spezifisch sind und wobei die monoklonalen Antikörper optional humanverträglich sind.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Virusinfektion eine Infektion mit Retrovirus, insbesondere Lentivirus, beispielsweise HIV, ist.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Virus Inhibitor ein Reverse Transkriptase Inhibitor, vorzugsweise ein Pyrimidin-Nukleosidanalogue, höchstvorzugsweise 3'-Azido-3'-desoxythymidin (AZT oder Zidovudine), ist und optional weiterhin zusätzlich andere hiervon verschiedene Nukleosidanalogue, vorzugsweise 3TC, in der pharmazeutischen Zusammensetzung enthalten sind.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich einen Proteaseinhibitor enthält und optional weiterhin zusätzlich andere, hiervon verschiedene Proteaseinhibitoren.
6. Pharmazeutische Zusammensetzung in einer Ausführungsform als Präparat oder als Präparatepaket, mit pharmazeutisch wirksamen Dosen der folgenden Wirkstoffkomponenten:
- a) vorzugsweise humanverträglichen monoklonalen Antikörpern, welche für CD28, vorzugsweise Human-CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten, vorzugsweise Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, oder einem Analog hierzu
 - b) einem Virus Inhibitor, vorzugsweise einem Reverse Transkriptase Inhibitor,
 - c) optional einem von b) verschiedenen Reverse Transkriptase Inhibitor,
 - d) optional einem Protease Inhibitor,
 - e) optional einem von d) verschiedenen Protease Inhibitor.
7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei die Wirkstoffkomponenten b) bis e) entsprechend der HAART Therapie ausgewählt, dosiert und darreichungsfertig hergerichtet sind.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6 oder 7,
wobei

5

die Wirkstoffkomponente b) ein Pyrimidin-Nukleosid analog,
vorzugsweise 3'-Azido-3'-desoxythymidin, ist und/oder

die Wirkstoffkomponente c) 3TC ist, und/oder

10

die Wirkstoffkomponente d) zwingend eingerichtet ist.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 6

15

bis 8, wobei die Wirkstoffkomponenten b) bis e) Bestand-
teil einer ersten Paketkomponente und die Wirkstoffkompo-
nente a) Bestandteil einer zweiten Paketkomponente sind.

20 10. Paketkomponente eines Präparatepakets nach einem der An-
sprüche 6 bis 9 enthaltend die Wirkstoffkomponente a).

11. Verfahren zur Behandlung von Virusinfektionen mit

25

Retrovirus, insbesondere Lentivirus, beispielsweise HIV,
wobei eine pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der
Ansprüche 6 bis 9 einem von der Virusinfektion befallenen
menschlichen Körper oder einem Körper eines niedrigeren
Warmblüters dargereicht wird.

30

12. Verfahren zur Behandlung von Virusinfektionen mit

Retrovirus, insbesondere Lentivirus, beispielsweise HIV,
wobei einem menschlichen Körper oder einem Körper eines

35

niedrigeren Warmblüters folgende Wirkstoffkomponenten in pharmazeutisch wirksamer Dosis dargereicht werden:

- 5 a) vorzugsweise humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche für CD28, vorzugsweise Human-CD28, spezifisch sind und T-Lymphozyten, vorzugsweise Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Be-
10 setzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren, oder ein Analog hierzu,
- b) ein Virus Inhibitor, vorzugsweise ein Reverse Transkriptase Inhibitor,
- 15 c) optional ein von b) verschiedener Reverse Transkriptase Inhibitor,
- d) optional ein Protease Inhibitor,
- 20 e) optional ein von d) verschiedener Protease Inhibitor.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Wirkstoffkomponenten b) bis e) entsprechend der HAART Therapie ausgewählt,
25 dosiert und dargereicht werden und wobei die Wirkstoffkomponente a) vor, zusammen oder nach den Wirkstoffkomponenten b) bis e) dargereicht werden.

30 14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei die Wirkstoffkomponenten b) bis e) kontinuierlich und die Wirkstoffkomponente a) einmal oder mehrmals in zeitlichen Abständen mit Ruhepausen, dargereicht werden.

wirksamen Dosis dargereicht bei fortfahrender Darreichung der Wirkstoffkomponente b)

5 iii) optional wird Stufe ii) nach einer vorgegebenen Ruhepause bei fortfahrender Darreichung der Wirkstoffkomponente b) einmal oder mehrmals wiederholt.

10 17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die Darreichung der Wirkstoffkomponente b) im Rahmen eines Behandlungsunterplans erfolgt, welcher die HAART Therapie ist.

15 18. Verwendung, pharmazeutische Zusammensetzung, Paketkomponente oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei der monoklonale Antikörper CMY-2, erhältlich aus Hybridomzellen gemäß Hinterlegung DSM ACC2353, oder Klon ANC28.1/5D10 oder eine vorzugsweise humanisierte bzw.
20 humanverträgliche Variante des Klons ANC28.1/5D10 ist.

25

30

35

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei

die Wirkstoffkomponente b) ein Pyrimidin-Nukleosidanalogue,
vorzugsweise 3'-Azido-3'-desoxythymidin, ist und/oder

5

die Wirkstoffkomponente c) 3TC ist, und/oder

die Wirkstoffkomponente d) zwingend eingerichtet ist.

10

16. Verwendung eines vorzugsweise humanverträglichen monoklonalen Antikörpers a), welcher für CD28, vorzugsweise Human-CD28, spezifisch ist und T-Lymphozyten, vorzugsweise Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der

15

T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktiviert, oder eines Analogen hierzu und eines Virus Inhibitors b), vorzugsweise eines Reverse Transkriptase Inhibitors, in Form einer Mischung oder von räumlich getrennten Zusammensetzungen, von denen die eine die Wirkstoffkomponente a) und die andere die Wirkstoffkomponente b) enthält, als Mittel zur kontinuierlichen und/oder unterbrochenen Anwendung bei der Behandlung von Virusinfektionen mit Retrovirus, insbesondere Lentiviren, beispielsweise von AIDS, bei Menschen oder niedrigeren Warmblütern nach einem Behandlungsplan, der einen oder mehrere Zyklen umfaßt, wobei der Behandlungsplan aus folgenden Stufen besteht:

20

25

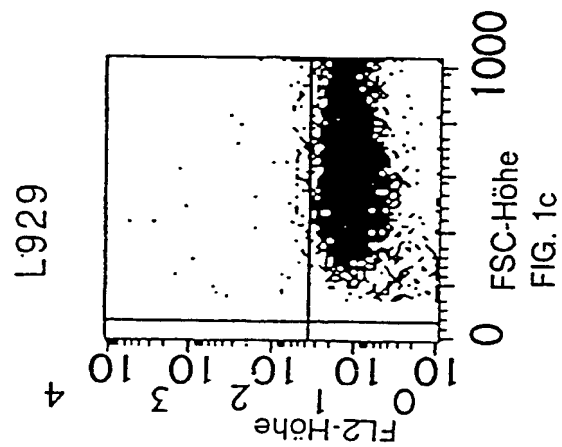
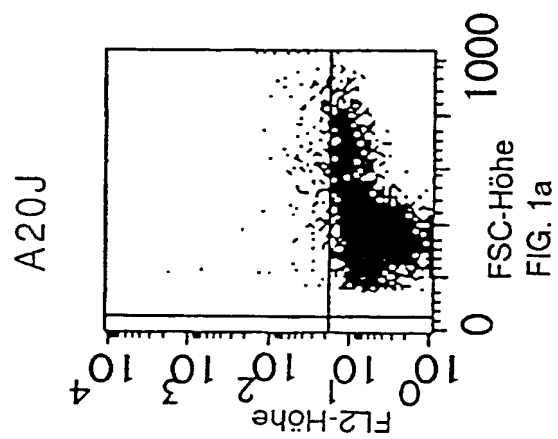
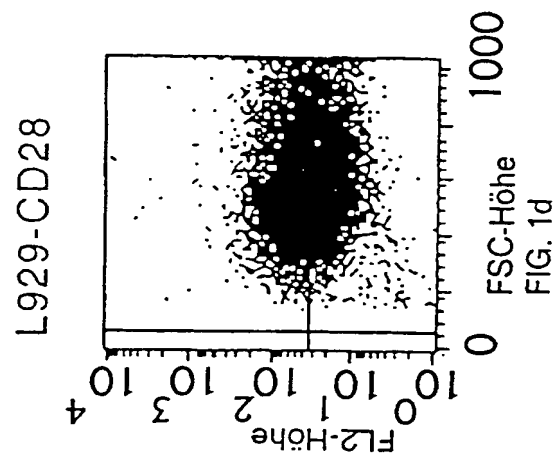
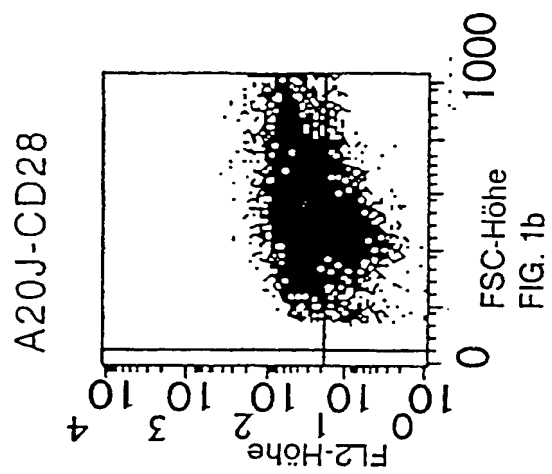
30

i) zunächst wird die Wirkstoffkomponente b) in einer pharmazeutisch wirksamen Dosis kontinuierlich dargereicht,

ii) nach einer vorgegebenen Dauer der Stufe i) wird die

35

Wirkstoffkomponente a) in einer pharmazeutisch



ANTI-CD28-PE



FIG. 2A

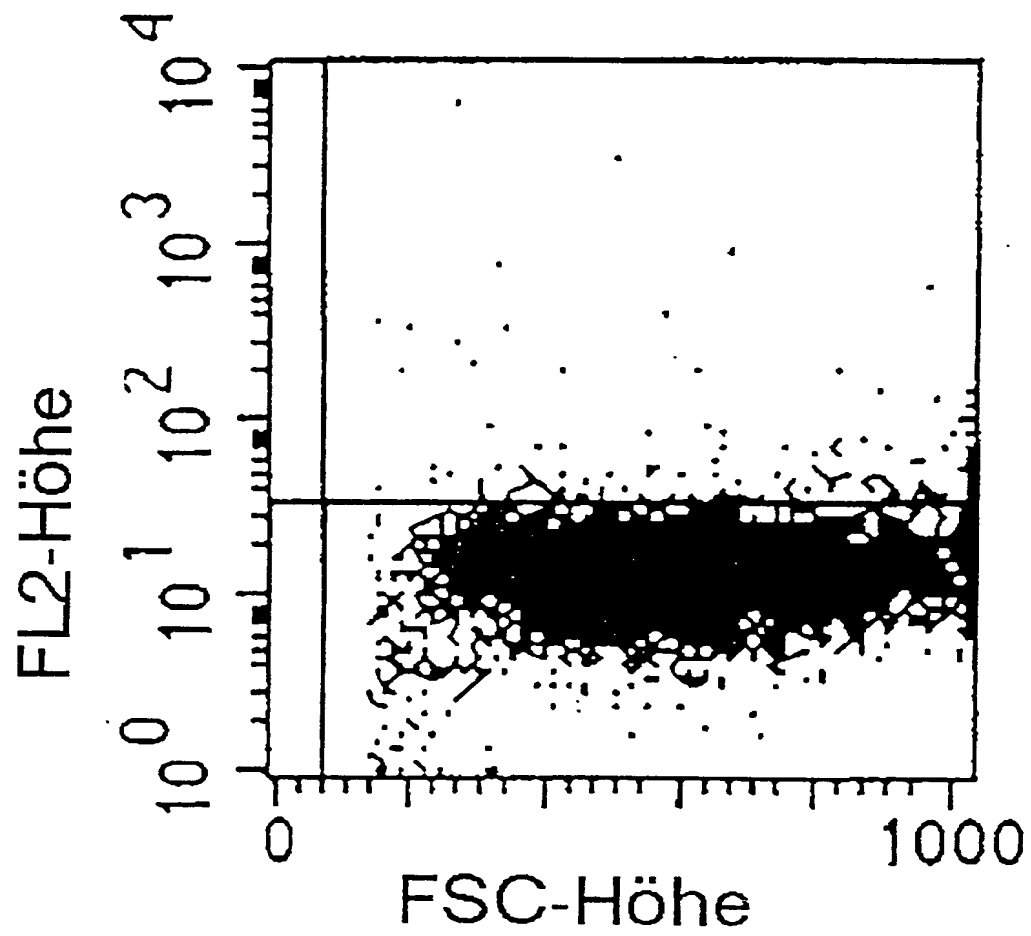


FIG. 2B

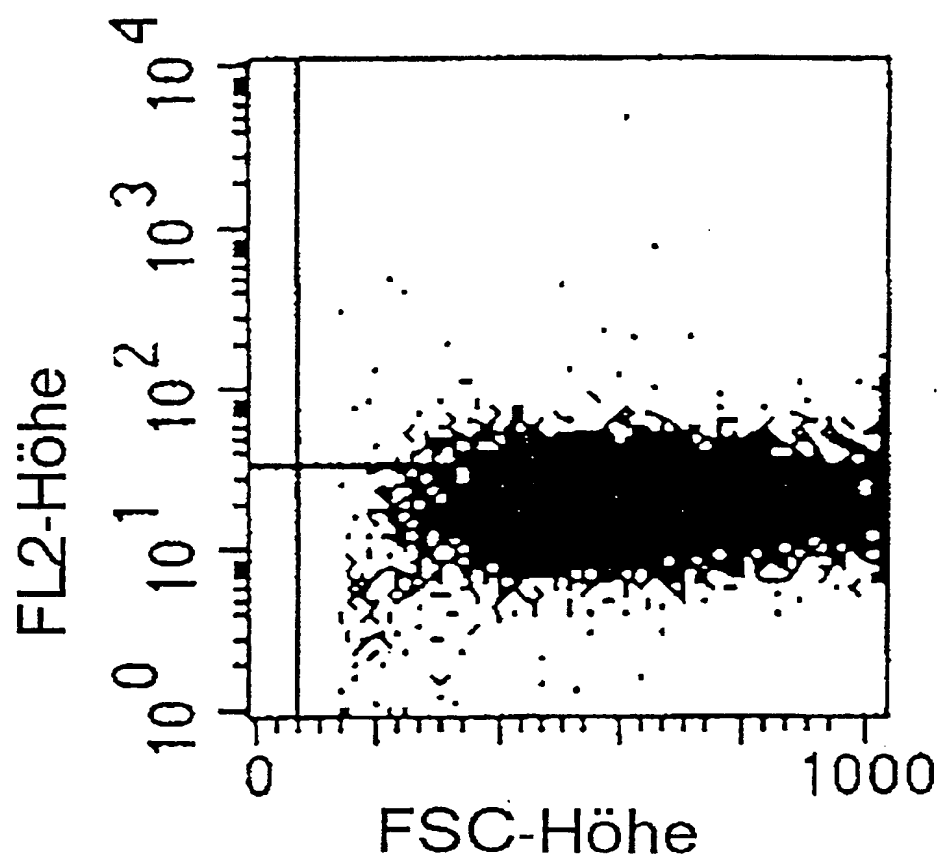
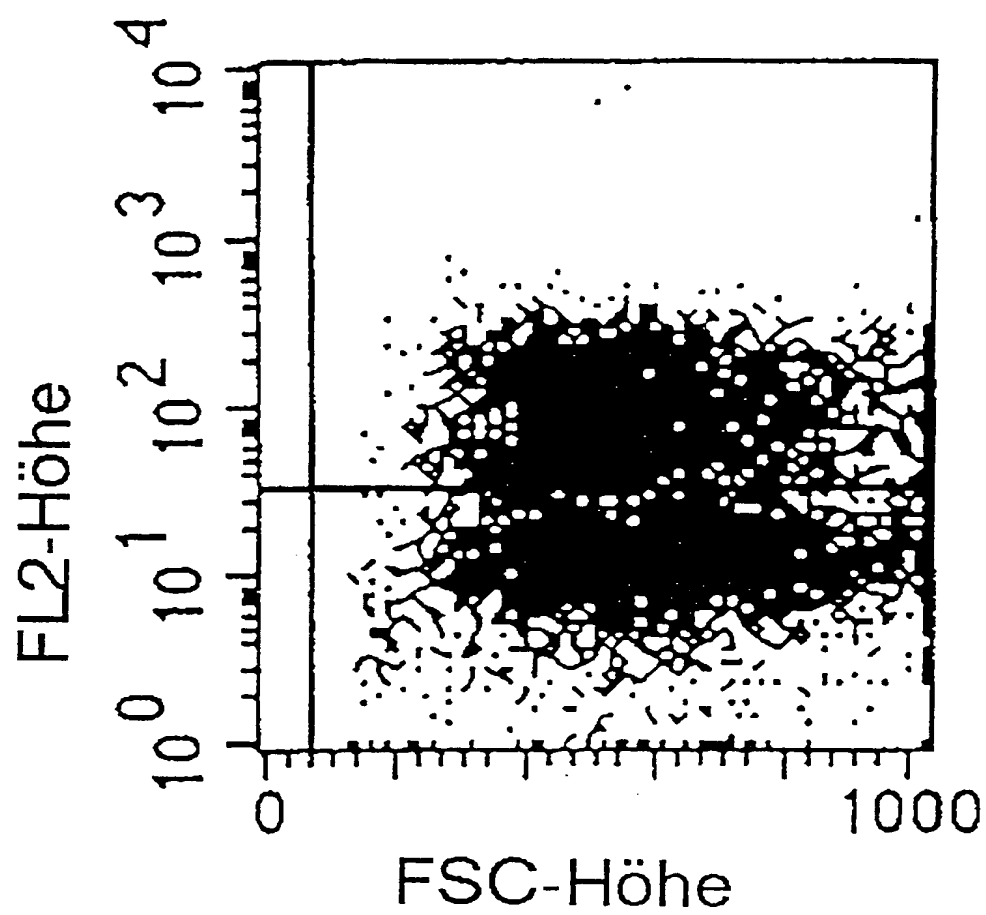


FIG. 2C



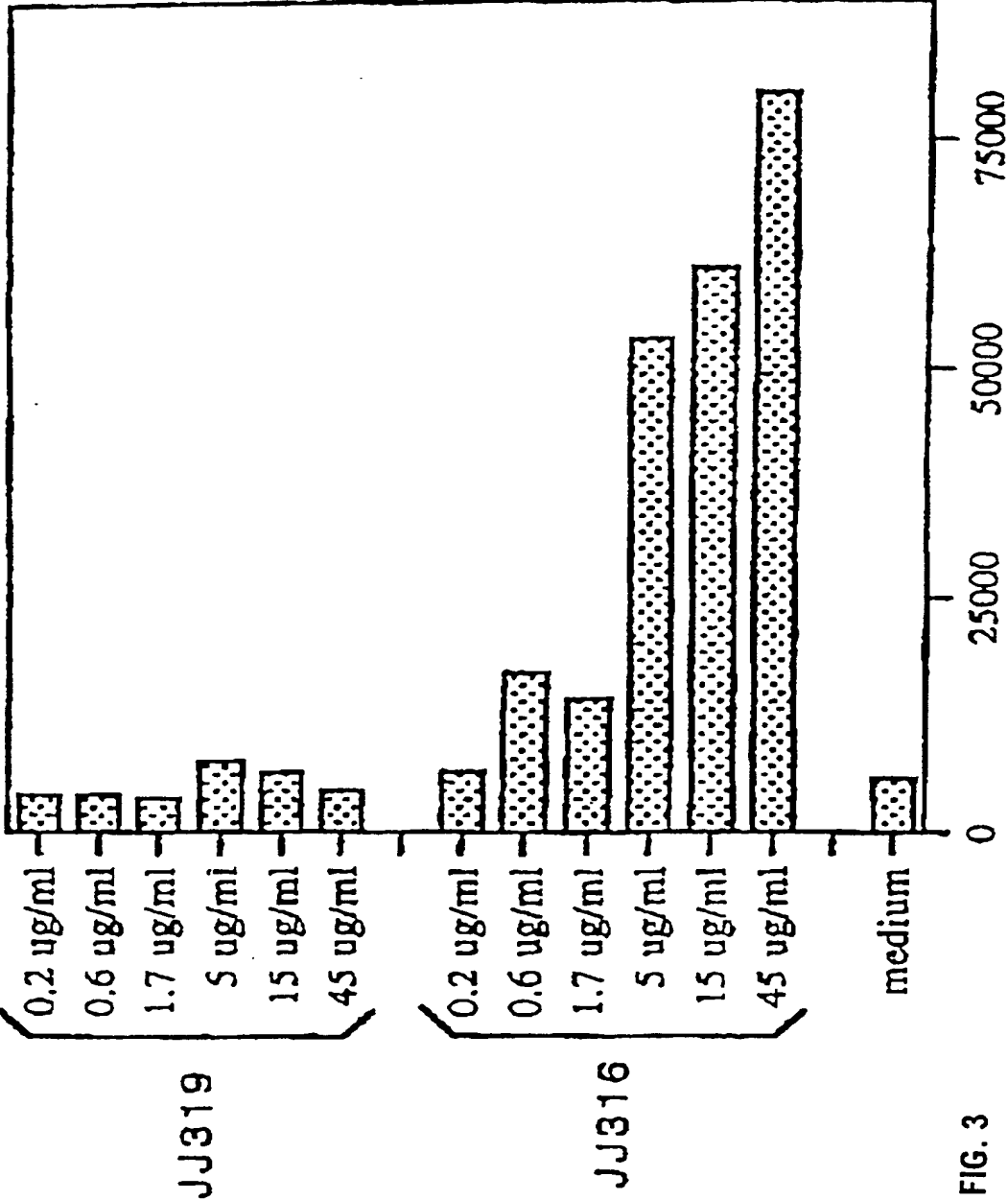


FIG. 3

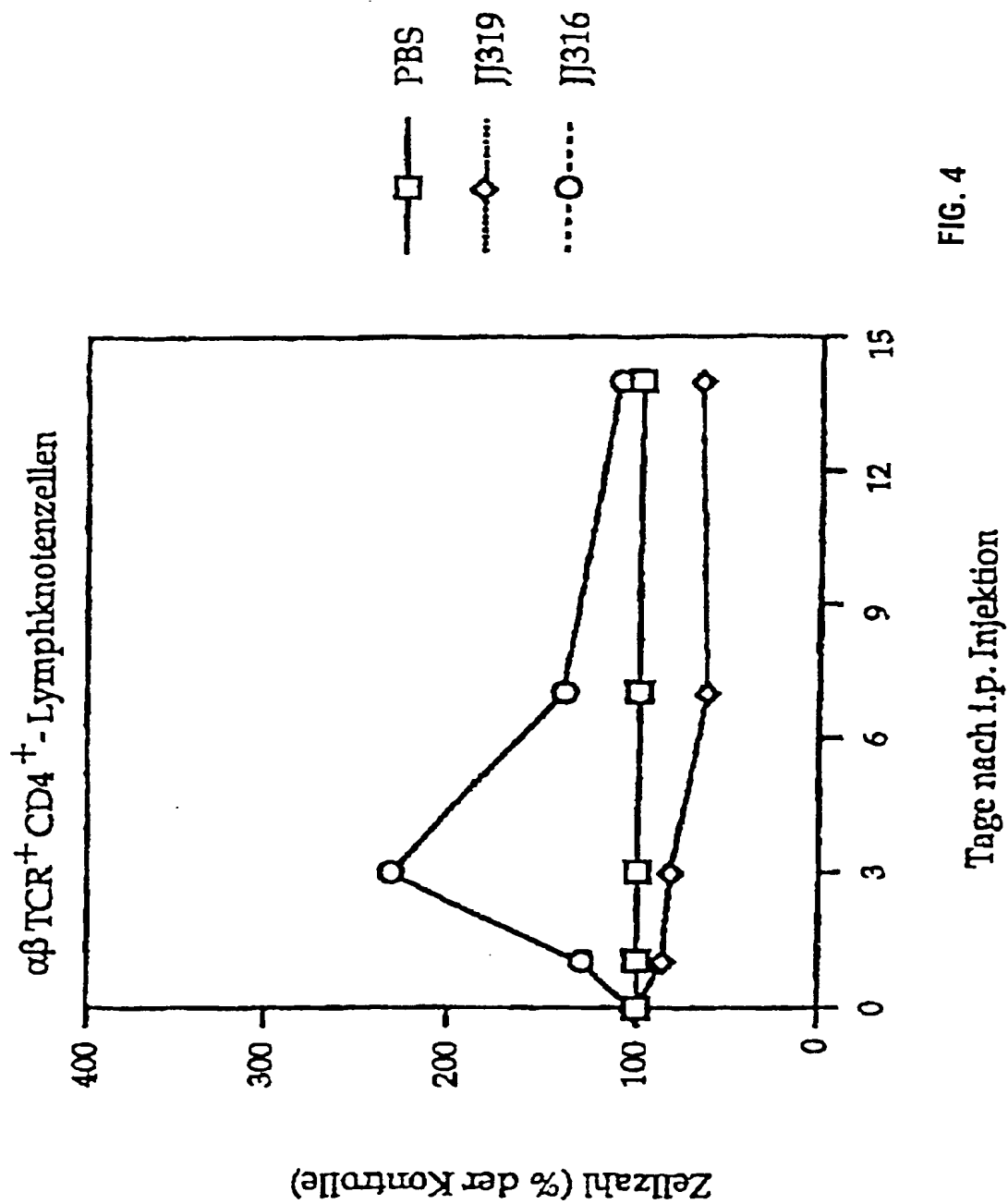


FIG. 4

7/16

FIG. 5a

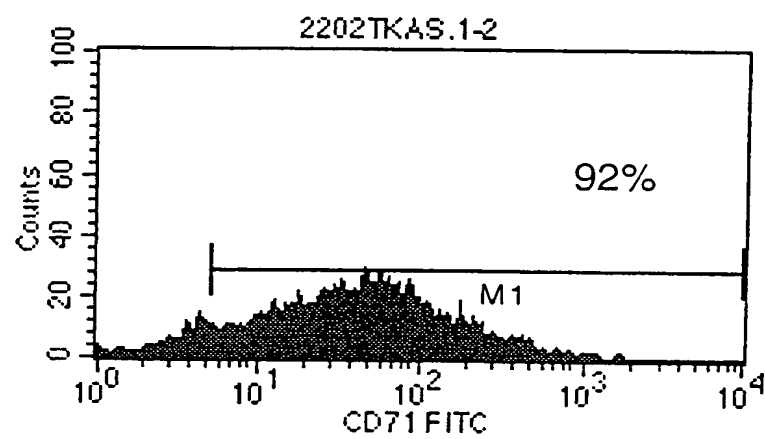
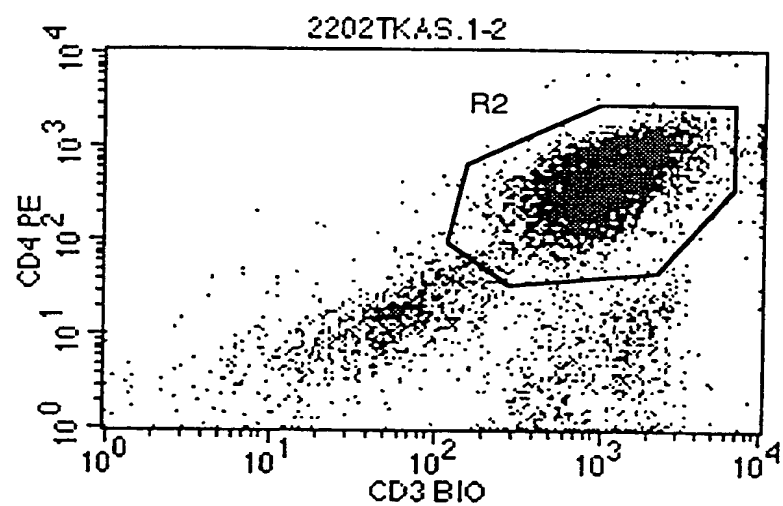


FIG. 5b

FIG. 6a

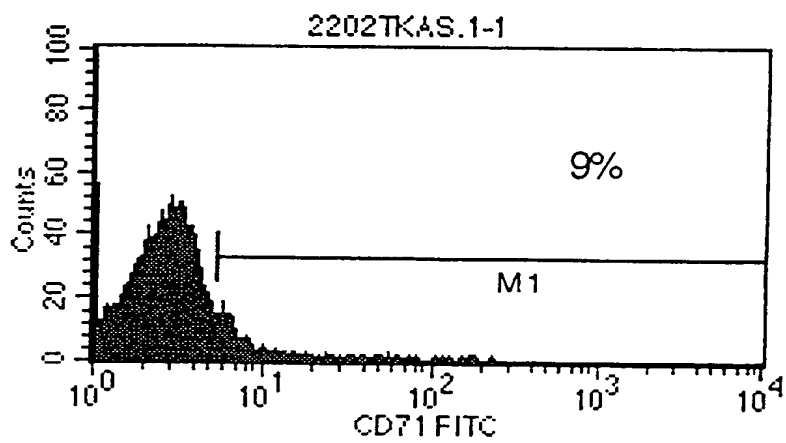
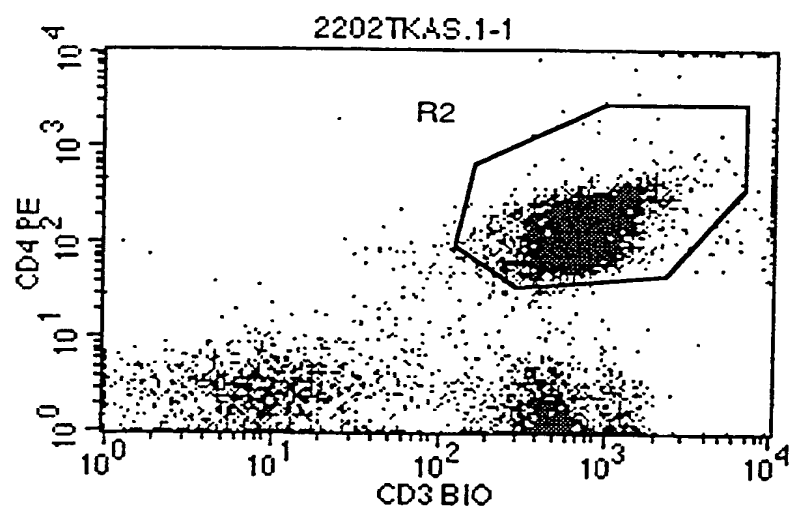


FIG. 6b

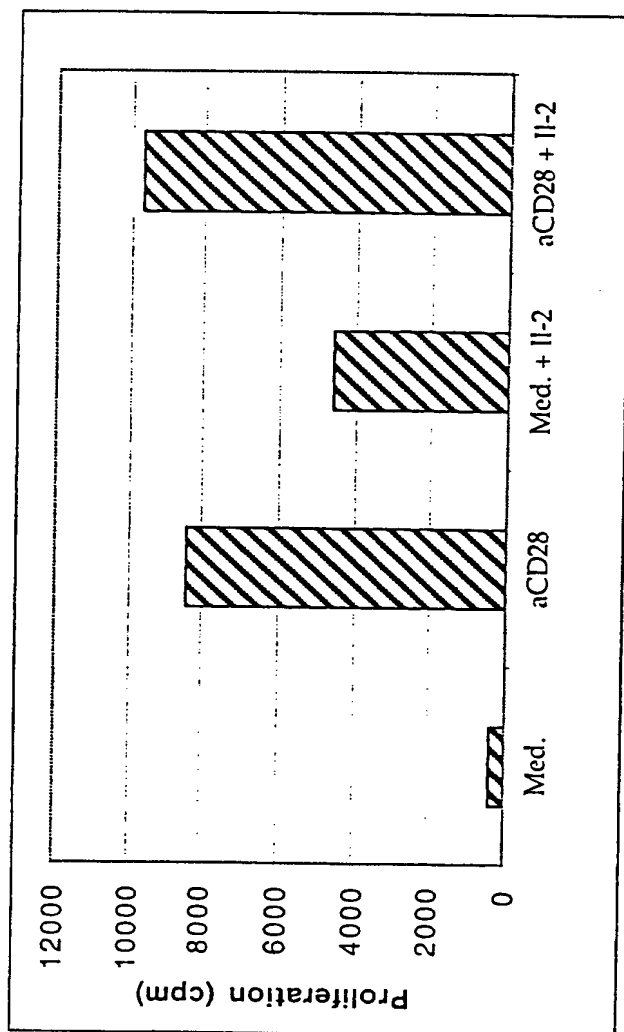


FIG. 7

FIG. 8A

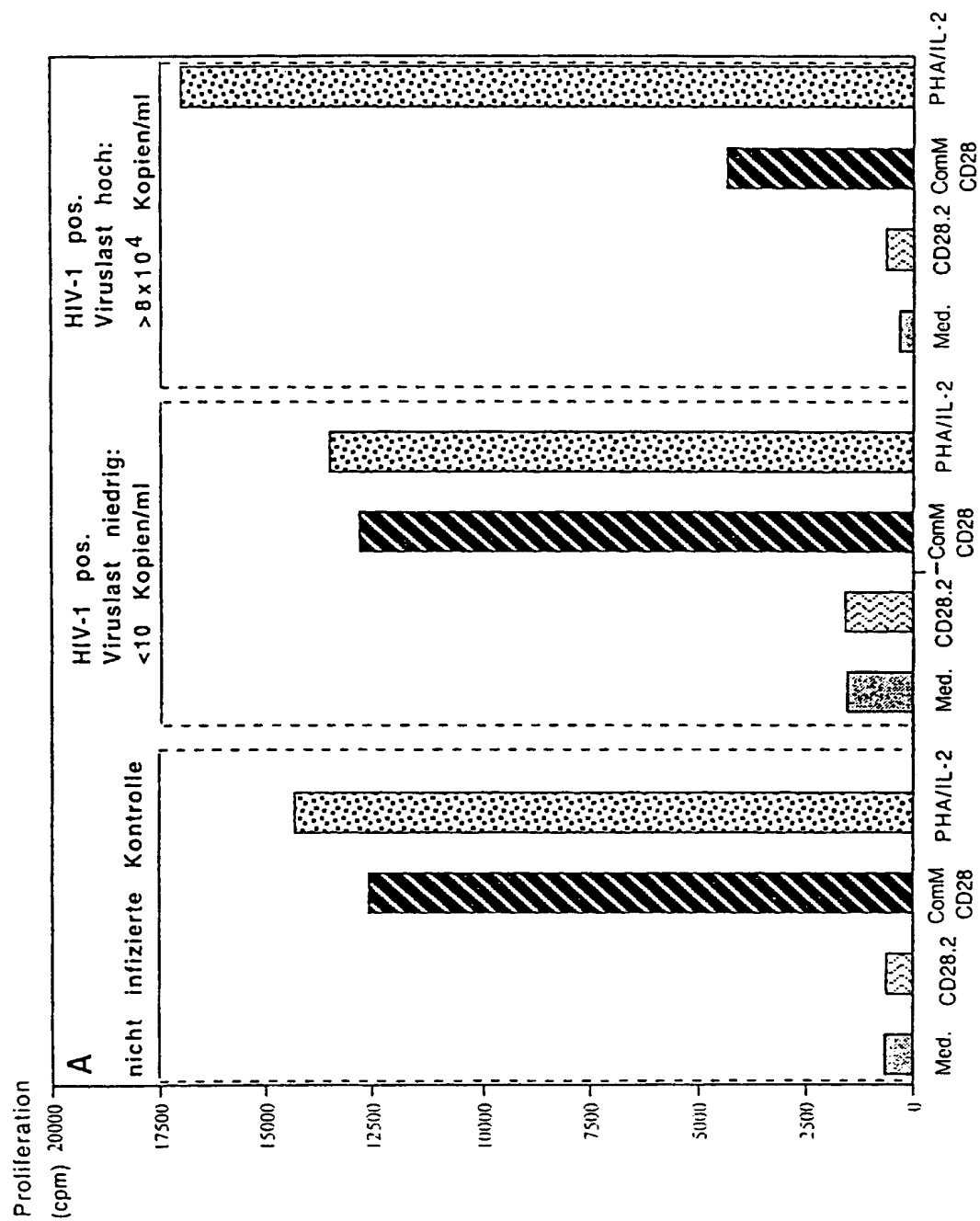
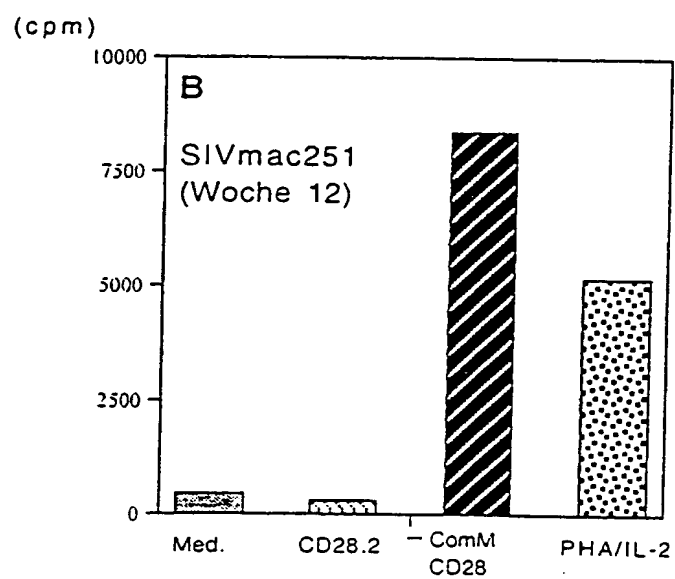
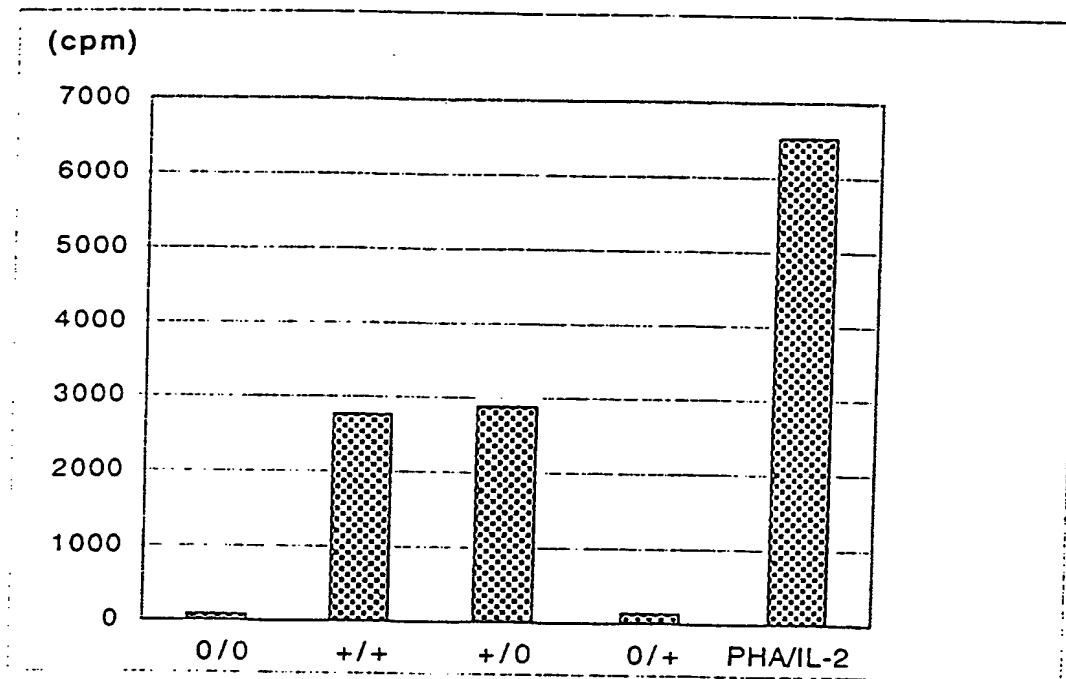


FIG. 8B



12/16

Proliferation



0/0	/	/
+/+	Anti-CD28	HAART
+/0	Anti-CD28	/
0/+	/	HAART

FIG. 9

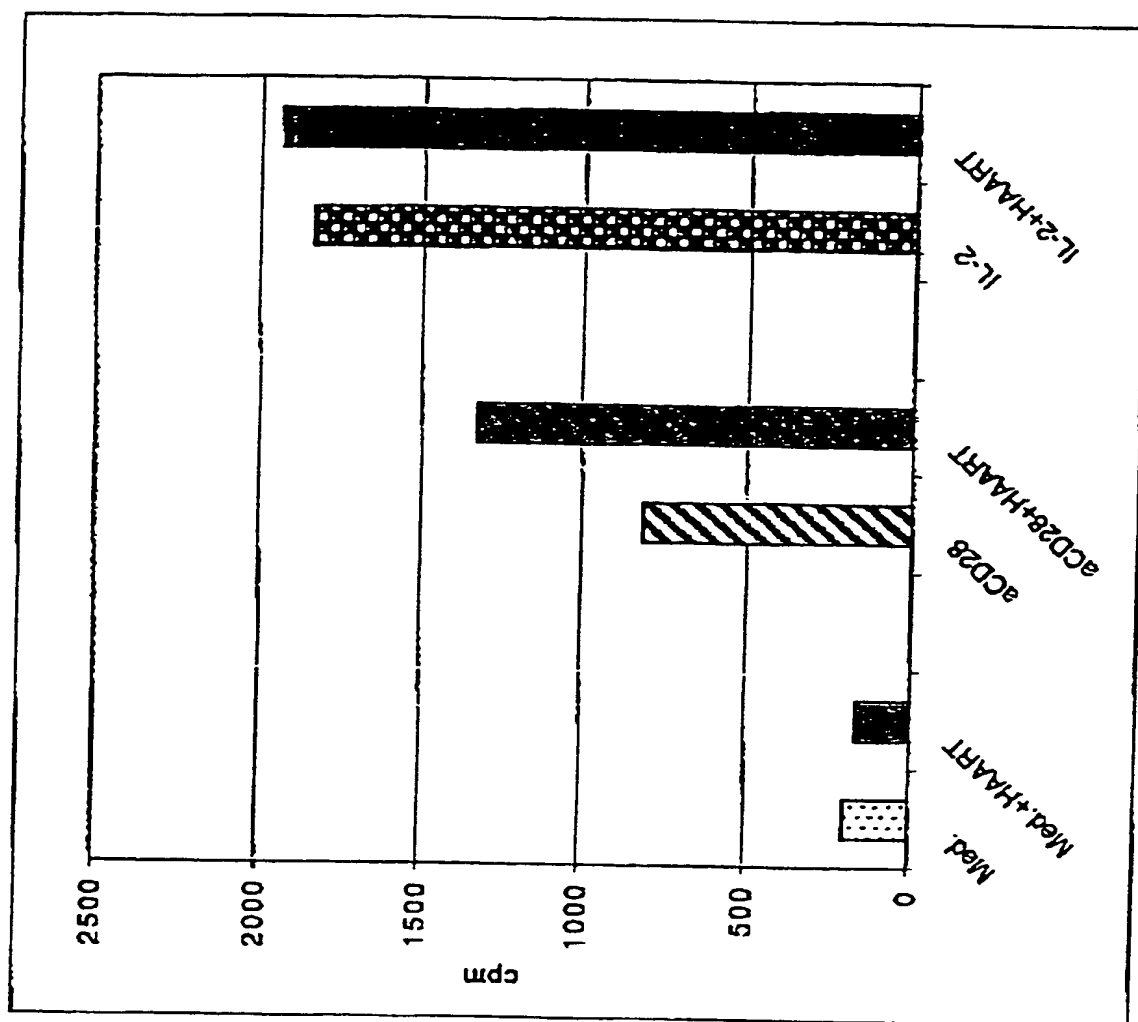
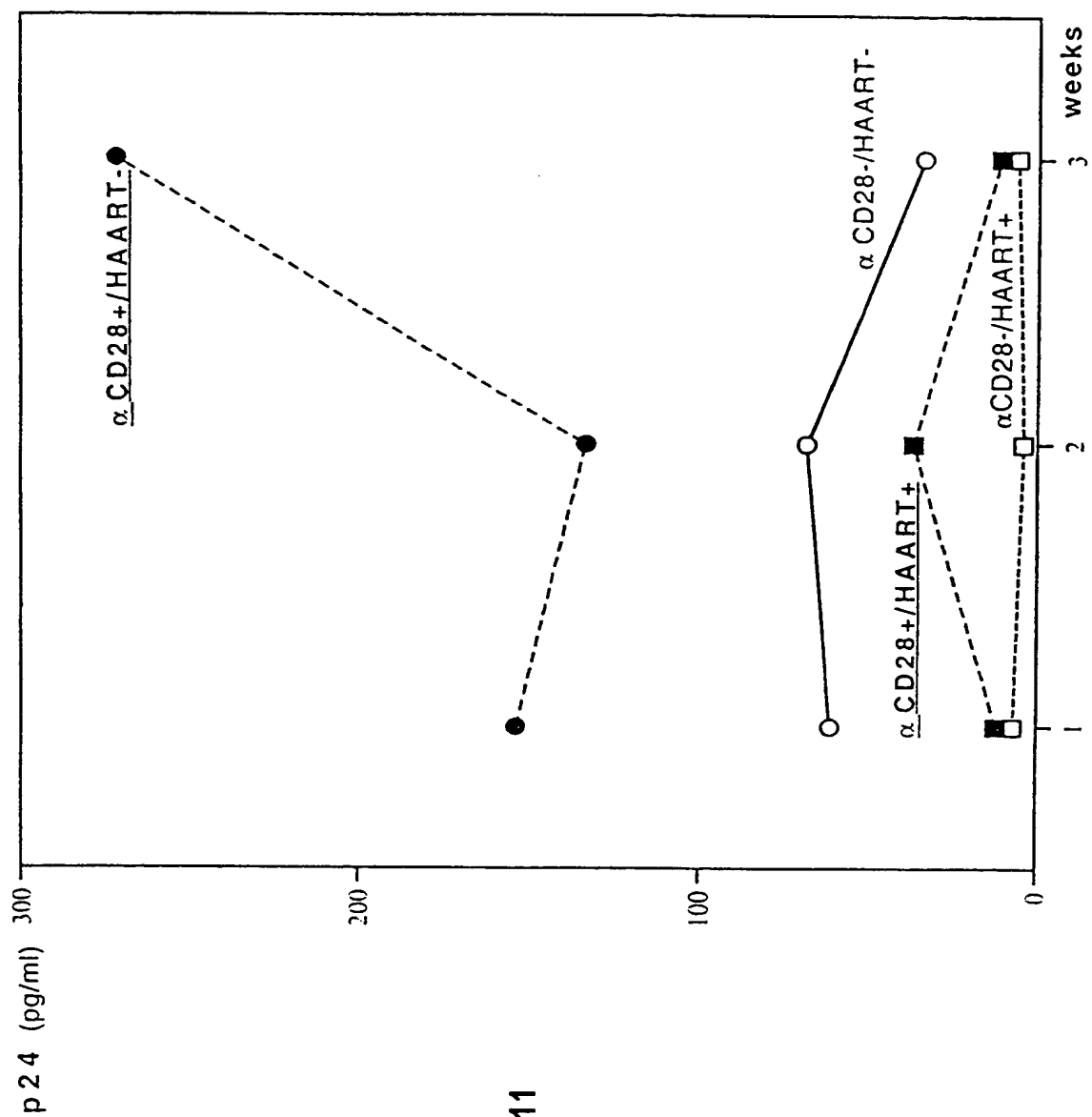
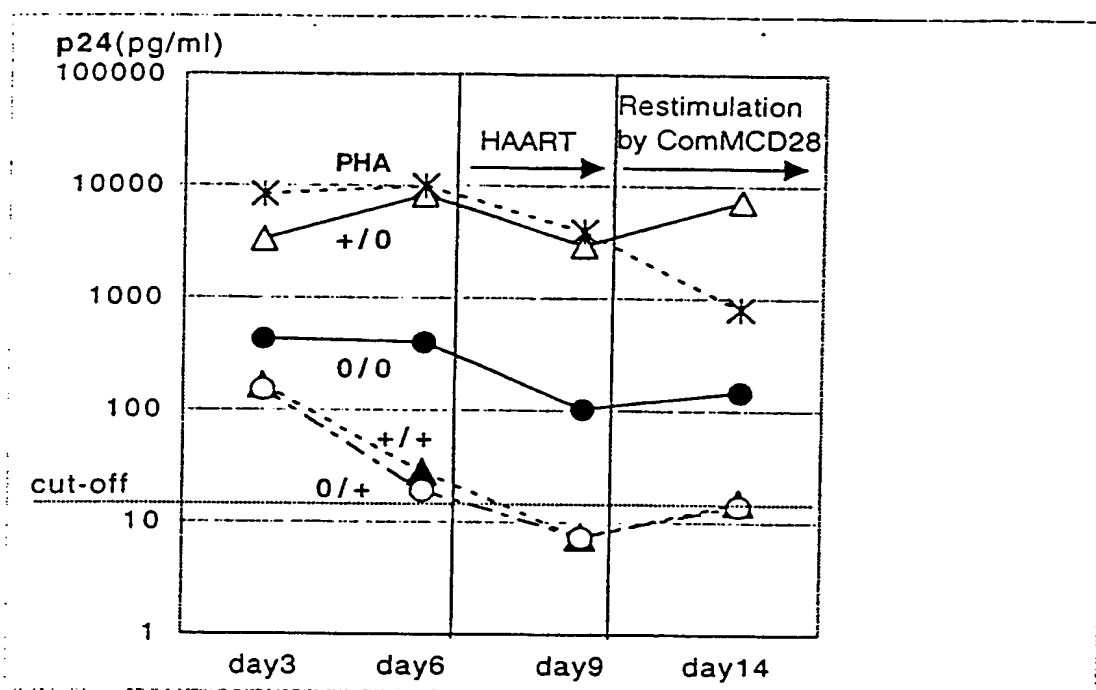


FIG. 10



15/16



0/0	/	/
+/+	Anti-CD28	HAART
+/0	Anti-CD28	/
0/+	/	HAART

FIG. 12

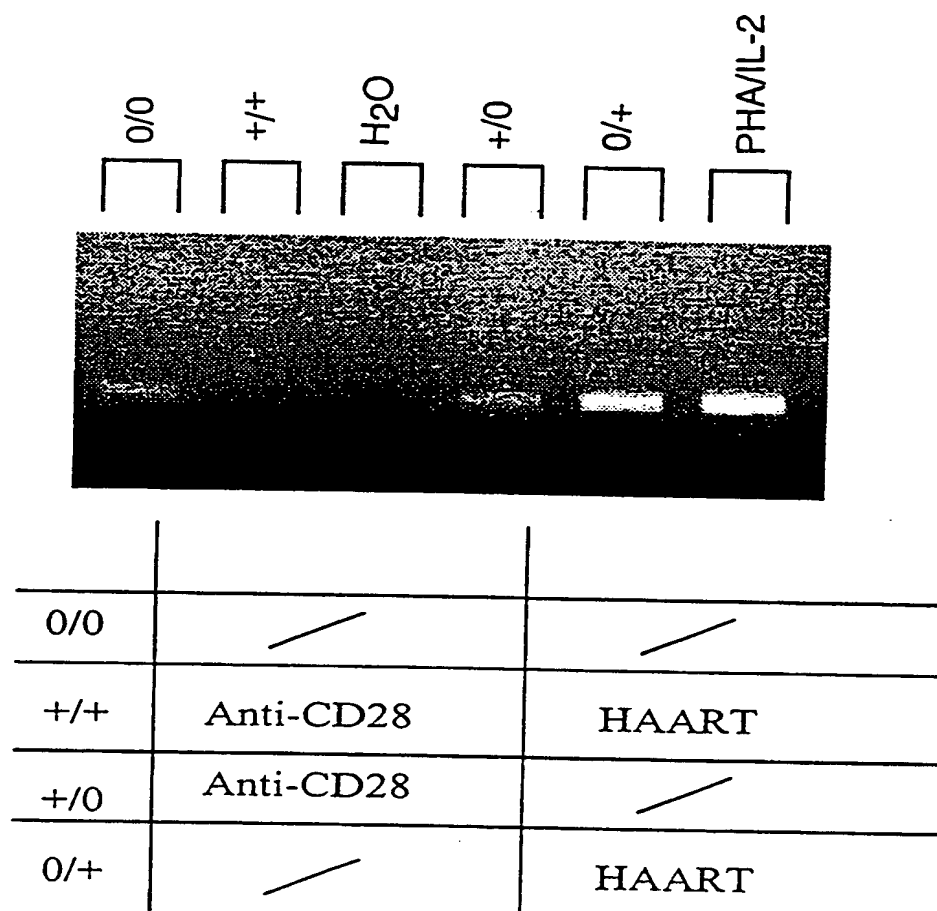


FIG. 13